UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ANDREIA ESPÍNDOLA VIEIRA

**Caracterização morfométrica e molecular do papel de
citocinas pró e anti-inflamatórias no processo de reparo
ósseo alveolar em condições homeostáticas e infecciosas**

**BAURU
2013**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ANDREIA ESPÍNDOLA VIEIRA

**Caracterização morfométrica e molecular do papel de citocinas
pró e anti-inflamatórias no processo de reparo ósseo alveolar
em condições homeostáticas e infecciosas**

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

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Versão corrigida

BAURU
2013

Vieira, Andreia Espíndola

V673c

Caracterização morfométrica e molecular do papel de citocinas pró e anti-inflamatórias no processo de reparo ósseo alveolar em condições homeostáticas e infecciosas/ Andreia Espíndola Vieira – Bauru, 2013.
181 p. : il. ; 31cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Nota: A versão original desta tese 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 (CEEPA) da FOB-USP
Protocolo nº: 029/2009
Data: 06/10/2009

DEDICATÓRIA

Dedico essa Tese...

A **Deus**, que por sua fidelidade e amor incondicional nunca me desamparou, e sem Ele nada seria possível.

Ao meu **esposo Francis Ribeiro**, grande amor da minha vida, por todo companheirismo, amor, compreensão, dedicação e incentivo.

Aos meus queridos **pais José Luiz e Dalva**, por todo amor e ensinamento, por sempre me apoiarem e serem esse alicerce tão importante em minha vida.

Ao meu **sogro Francisco** e minha **sogra Neuza**, por me receberem como filha e por todo amor, carinho, incentivo e compreensão.

Aos meus **irmãos e todos os meus cunhados e cunhadas**, por tudo que representam para mim e em especial à **Aline, Zé Luiz Neto & Adriana**.

Ao meu **avô José** e minha **avó Maria (*in memorian*)**, por todo ensinamento e pelas boas lembranças dos anos de convivência que deixaram muitas saudades.

Ao meu **orientador Prof. Dr. Gustavo Garlet**, pela oportunidade e todo aprendizado proporcionado.

AGRADECIMENTOS

“Àquele que é poderoso para fazer infinitamente mais do que tudo que pedimos ou pensamos...a Ele seja a Glória” Ef. 3:20 e 21

A **Deus**, minha imensa e eterna gratidão, pela fidelidade dEle em todos os momentos da minha vida. Ele que é a razão do meu existir, esse Deus maravilhoso que nos constrange com seu amor incondicional e que nunca nos abandona, sejam quais forem às circunstâncias. É impossível olhar para trás, sem perceber que a sua mão de poder esteve cuidando de cada detalhe. Ao Senhor em quem eu sei que posso confiar e que faz com que todas as coisas, no seu devido tempo, cooperem para o bem daqueles que O amam. Agradeço a Ele também por ter colocado no meu caminho pessoas tão especiais, com as quais eu pude contar e que foram fundamentais para a concretização desse sonho.

Ao meu digníssimo **esposo Francis Ribeiro**, que tanto amo, por ser esse presente que Deus colocou em minha vida na hora certa. Agradeço pela sua amizade, seus conselhos, sua paciência, além de todo carinho, amor, dedicação e companheirismo. Obrigada por me fazer tão feliz, por sempre me apoiar, incentivar, por compreender os momentos de ausência, por acreditar nos meus sonhos e cooperar para que eles se tornassem possíveis.

Aos meus amados **pais José Luiz e Dalva**, os quais nem mesmo a distância consegue afastar e que, com simples palavras, já são capazes de me animar e me incentivar a prosseguir. Agradeço as orações, os conselhos, todo o carinho, amor, ensinamento, confiança e por também acreditarem e me apoiarem nos meus sonhos. Serei eternamente grata por serem meu alicerce em todos os momentos da minha vida.

Aos meus novos pais, meu **sogro Francisco** e minha **sogra Neuza**, que realmente me receberam como filha. Agradeço o carinho, amor, conselhos, orações, palavras de incentivo e por compreenderem os momentos que o Francis e eu tivemos que abrir mão da convivência com a família.

Ao meu **orientador Prof. Dr. Gustavo Garlet**, a quem de forma carinhosa e respeitosa me refiro como “Chefe”, e que mesmo sendo já renomado e reconhecido por seu trabalho, foi receptivo e prontamente aceitou me orientar sem nem me

conhecer. Por me inspirar a buscar compreender os fascínios da imunologia. Agradeço sua confiança, todas as oportunidades e ensinamentos que engrandeceram imensamente a minha formação, bem como as orientações com conversas sempre esclarecedoras, achando soluções e simplificando os problemas, desatando nós de forma prática e mostrando um caminho mais além. Sempre terei eterna gratidão e admiração tanto como pessoa, quanto por seu grande exemplo como profissional, que realmente gosta do que faz, sempre ocupado, mas ao mesmo tempo disponível, conseguindo conciliar tantas coisas ao mesmo tempo, e ainda sendo um paizão tão dedicado para o Pedro. Ainda tenho muito a aprender com você.

À minha querida **irmã Profa. Aline**, que pra mim na verdade é muito mais que uma irmã caçula é quase uma filha, da qual eu tenho muito orgulho e admiração. Agradeço pelos agradáveis anos de convivência e por tudo que você representa pra mim, que mesmo à distância continua uma grande amiga. Também ao meu cunhado Cássio um exemplo de esforço e trabalho, mostrando que realmente gosta do que faz e por fazer minha irmã feliz.

Ao meu **irmão mais velho, Prof. Dr. José Luiz Neto**, que iniciou o caminho da pesquisa em minha família e que serviu de exemplo para que eu também trilhasse essa trajetória desde a minha iniciação científica. Também a minha querida **cunhada Adriana**, que já era minha amiga mesmo antes de entrar para a família, agradeço a amizade, o incentivo e principalmente por fazer meu irmão muito feliz.

Aos meus **cunhados Cláudia & Diego** e seus **filhos Matheus, Rafaela e Isabela; Flávia & Ailton** e seu **filho Ailton Jr. (Juninho)** e à minha **cunhada Gláucia** e seu namorado **Alexandre**, por todo o carinho, amizade, apoio e incentivo, pela agradável convivência, por tudo que já fizeram por mim e pelo Francis, e principalmente por compreenderem os momentos de ausência.

À **Família Ribeiro**, por todo amor, incentivo, compreensão e por me receberem de forma tão carinhosa como parte dessa grande e querida família.

Ao **Tio Carlos & Tia Darci** e família, agradeço por serem sempre tão amorosos, atenciosos e por tudo que já fizeram por mim e pela minha família.

Ao **Tio Zé Espíndola & Tia Nereide**, e suas filhas **Isabela, Silvânia e Suélen**, que me acolheram como filha quando cheguei à Uberlândia. Jamais

esquecerei todo carinho e tudo que fizeram por mim. Vocês também fazem parte da minha conquista e terão sempre minha eterna gratidão.

Ao **Rubens & Luzia, Rodrigo, Marcos & Carol, Camile e Milena**, primos que descobri quando me mudei pra Bauru e que me receberam tão prontamente, de forma tão carinhosa e prestativa, muito obrigada por tudo.

Aos **demais familiares** pelo amor, carinho, consideração e incentivo.

Aos **membros da Banca** por tão prontamente aceitarem o convite, pelo tempo despendido e por todas as sugestões e contribuições, enriquecendo ainda mais a Tese e as respectivas publicações.

À **Profa. Dra. Ana Paula Trombone Garlet**, sempre muito querida e cativante, agradeço a parceria nos trabalhos científicos, o carinho e os agradáveis momentos de confraternização.

Ao **Prof. Dr. Rumio Taga**, a quem eu respeito e admiro por todo conhecimento transmitido de forma tão sábia e ponderada, sanando muitas dúvidas. Agradeço também por juntamente com sua esposa e suas filhas, serem sempre tão receptivos ao nos receberem em sua casa para os famosos e esperados churrascos da Histologia.

Ao **Prof. Dr. Gerson Assis**, sempre alegre e prestativo, um grande exemplo de como aliar conhecimento e generosidade ao ensino.

À **Profa Dra. Camila Rodini**, por todo respeito, consideração, amizade e as futuras parcerias que virão.

À **Profa Dra. Ana Paula Campanelli**, por nos instigar a ir mais além e por todos os conhecimentos transmitidos com a disciplina de “Tópicos em Imunologia Celular” e que foram fundamentais para o meu aprendizado.

Ao **Prof Dr. Carlos Santos**, pelo seu exemplo de pessoa e profissional e por todos os ensinamentos científicos e filosóficos.

À **Profa Dra. Lucimara Teixeira**, por todo carinho e amizade.

Ao **Prof. Dr. Antônio de Castro (Prof. Tom)**, que quando era o coordenador do programa, respondeu tão prontamente ao meu primeiro contato por email. Um grande exemplo de pessoa educada e atenciosa.

Aos **demais Professores da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP)** por fazerem essa instituição tão reconhecida e prestigiada.

À **Dra. Tânia Mary Cestari**, pela amizade, por estar sempre pronta e disposta a ajudar sem nenhuma objeção e pelas conversas científicas e nem tão científicas assim.

Às técnicas **Daniele Ceolin (Dani)** e **Patrícia Germino (Paty)** pela amizade e pela imensa colaboração no processamento das amostras e concluindo grande parte da confecção das minhas lâminas.

À secretária **Teresa (Tê)** pela amizade e por ser sempre prestativa e eficiente, fazendo sempre mais do que pedimos, além de sua animação contagiante e por incentivar as confraternizações no Laboratório.

Ao doutorando **Bruno Cavalini Cavenago**, pela parceria e imensa colaboração com as microtomografias que complementou este trabalho.

À **Dona Divina** pelos tão esperados cafezinhos logo pela manhã e após o almoço.

À **Élcia Varize Silveira**, sempre amiga, divertida, conselheira e companheira no Laboratório aos finais de semana. Agradeço a amizade, os conselhos, incentivos e todo apoio. Bem à sua família **Eduardo** e seus **filhos Ana Paula e Lucas**, pelo agradáveis momentos de confraternização.

Ao **Carlos Eduardo Repeke (Cadu)**, meu companheiro de cirurgias, agradeço suas colaborações, parcerias, os primeiros desenhos do Laboratório e seu exemplo de determinação, especialmente esportiva. À você, juntamente com a **Daiane (Daia)**, agradeço a amizade.

Ao **Samuel Ferreira Jr.**, que juntamente com o **Cadu** padronizaram a técnica de extração do incisivo dos camundongos que utilizei em minha Tese.

À **Cláudia Bigueti**, pela companhia e conversas nos almoços do Bandejão, pelos auxílios com as cirurgias e com as imagens de microtomografia, por sua contribuição artística e profissional aprimorando nossos desenhos do Lab, pela idéia e elaboração da minha capa. E juntamente com o **Hagner**, pela amizade.

À **Carol Francisconi**, pela amizade, pela agradável convivência, pelo auxílio sempre que solicitada, por seu exemplo de família e por juntamente com o seu **namorado Edson (Ni)** terem sido agradáveis companhia de viagem.

À **Ana Cláudia Araújo-Pires**, pelas discussões científicas e nem tão científicas assim, por ter conquistado respeito e admiração, por sempre se prontificar em ajudar e juntamente com o **Aristeu** e filhas agradeço a amizade.

À **Priscila Colavite** pela amizade e demais colaborações.

À **Gabi Gennaro**, pela amizade, conversas, risadas, e também por ser exemplo de pessoa batalhadora e esportista.

À **Marcela Claudino** pela amizade e mesmo com o pouco tempo de convivência mostrou-se uma pessoa determinada e muito competente.

À **Adriane Togashi**, pela amizade e colaboração em outros trabalhos.

À **Andressa Aranha**, pela amizade no pouco tempo de convivência.

Aos demais amigos do Laboratório **Bruna Bighetti, Ricardo Arantes, Carol Rocha, Renato, Paulinha, Daniela, Tamiris, Ever Mena e Thais Gazeta**, pela amizade, pela agradável convivência, conversas, inclusive companhia no Bandejão.

Aos meus três **alunos de Iniciação científica: Fabiana Paganotti Roque, Raíssa Gonçalves Carneiro Spera de Andrade e Alexandre Macedo Batitucci Ambrósio**, por ter tido a oportunidade de co-orientá-los.

À **Carina Melo**, pela amizade e pelas palavras de incentivo, ânimo e fé. E pelos agradáveis momentos de confraternização na companhia do seu esposo **Renato** e dos seus pais **Dário e Lúcia**.

Aos **amigos do Laboratório de Microbiologia, Thaís Gasparoto, Hayana Ramos, Carine Oliveira, Cláudia Pinheiro** e secretária **Dalva**, pelo carinho e amizade. Agradeço em especial ao técnico **André** por preparar as soluções de bactéria utilizadas para induzir a alveolite experimental.

Aos **amigos do Laboratório de Patologia Ana Regina Moreschi, Heliton Lima, Karen Pinke, Priscila Tobouti**, pela agradável convivência e amizade.

Às **amigas fonodílogas Fernanda Zucki, Marcela Silva e Maria Cecília de Freitas Ferreira** pela amizade desenvolvida ao cursarmos disciplinas juntas.

À **Sandra Matsuda**, pela amizade e por ser essa pessoa simples, competente, animada e sempre sorridente.

Aos **demais colegas de disciplina** e que na convivência se tornaram amigos

Aos **Técnicos do Biotério** tanto da **FOB** quanto da **FMRP**, em especial ao técnico **Júlio Anselmo Siqueira** do Centro de Criação de Camundongos Especiais.

Aos **Técnicos Thiago e Thelma**, pela amizade.

À secretária da Biologia Oral **Vera Rufino** pelos serviços prestados.

À **Rita**, secretária da FAPESP, pela amizade e os auxílios prestados.

Aos amigos do **Grupo Semente**, tanto pelos momentos de edificação e fortificação da fé, quanto pelos agradáveis momentos de descontração.

À minha “primeira orientadora” **Profa Dra. Paula Dechichi**, agradeço os anos de convivência, por ter feito eu me apaixonar ainda mais pela Histologia sendo minha professora no primeiro ano de graduação, e me orientando tanto na Iniciação Científica, quanto no Mestrado. Obrigada pelos ensinamentos, conselhos e também por me incentivar a enfrentar os novos desafios. Um grande exemplo de pessoa e profissional, conseguindo conciliar a vida acadêmica e familiar. Sempre serei eternamente grata por tudo.

Aos antigos **Colegas e Professores do ICBIM da UFU** que mesmo não contribuindo diretamente para essa Tese, foram de fundamental importância na minha formação como Histologista e me incentivando a seguir novos caminhos.

À **Profa. Dra. Camilla Christian**, pela amizade, pela antiga parceria nas pesquisas e por ter me incentivado a vir pra Bauru.

E aos **demais amigos de Uberlândia** inesquecíveis pela amizade, carinho, consideração e incentivo.

Enfim, o meu carinho e sinceros agradecimentos, a todos que de alguma forma contribuíram na execução deste trabalho. E a todos os meus queridos amigos que indiretamente foram fundamentais para o meu crescimento pessoal e profissional. Pois o mais importante em nossas conquistas é sabermos reconhecer o valor de todos aqueles que estiveram conosco nesses momentos.

...Muito obrigada a todos !!!

“Grandes coisas o Senhor tem feito por nós por isso estamos alegres”. Salmos 126:3

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Universidade de São Paulo (USP).

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB – USP).

À Disciplina de Histologia e Embriologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP – USP).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), órgão de fomento que proporcionou a minha bolsa de Doutorado e viabilizou o desenvolvimento deste trabalho (Processo nº 2009/11496-1) e dos demais que participei em colaboração.

.

**“Quem é sábio procura aprender, mas os tolos
estão satisfeitos com a sua própria ignorância.”**

Provérbios 15:14 (Versão Linguagem de hoje)

**“Por isso dediquei-me a aprender, a investigar, a
buscar a sabedoria e a razão de ser das coisas...”**

Eclesiastes 7:25a (Nova Versão Internacional)

RESUMO

O metabolismo ósseo é influenciado por fatores endócrinos, genéticos, de crescimento, sistema RANK/RANKL/OPG, além de uma variedade de moléculas regulatórias, como as citocinas. Citocinas têm sido implicadas na patogênese de doenças ósseas, no entanto, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na interação entre o sistema ósseo e imunológico no processo de reparo ósseo. O objetivo deste estudo foi caracterizar o papel de TNF- α e IL-10 no reparo ósseo alveolar em condições homeostáticas (controle [C]) e infecciosas (alveolite experimental [A]) pós exodontia em camundongos C57Bl/6 (WT), TNFp55KO e IL-10KO. Após a cirurgia nos grupos infectados foi induzida a alveolite por meio de isquemia do alvéolo e uma suspensão de secreção purulenta. As maxilas foram coletadas em 0h, 7, 14 e 21 dias após a extração do incisivo superior para análises histológica, histomorfométrica e molecular (RealTimePCR). Na análise histomorfométrica foram quantificados os parâmetros coágulo, células inflamatórias, fibras, fibroblastos, vasos sanguíneos, matriz óssea, osteoblastos, osteoclastos, e outros – espaço do líquido intersticial e medula óssea. Na análise molecular (RealTimePCR) foram quantificados a expressão de fatores de crescimento, marcadores ósseos e de matriz extracelular, citocinas e quimiocinas envolvidos no processo. Os dados obtidos foram submetidos ao teste OneWay ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey. Os resultados demonstraram que nos camundongos WT-C houve a formação inicial de coágulo (0 hora) com início da expressão de BMP2, BMP4, BMP7, TGF β 1 and VEGFa que tiveram aumento gradativo com pico em 7 dias. A expressão de TNF- α e IL10 também tiveram seus picos aos 7 dias em paralelo com contagem de leucócitos, associado com a expressão de CCL2, CCL5 e CXCL1. Nos períodos seguintes houve uma diminuição inflamatória e o aumento de marcadores osteoblásticos/osteogênicos. A indução da alveolite experimental em WT-A resultou no aumento marcante na expressão de TNF- α , acompanhada por uma maior expressão de CXCL1 e CCL5, contagem aumentada de leucócitos e diminuição na expressão de IL-10 que só atingiu seu pico aos 14 dias, além de proeminente infiltrado leucocitário e tecido de granulação, bem como evidências histológicas de atraso no reparo ósseo. O impacto negativo da alveolite foi atenuado nos camundongos TNFp55KO, caracterizado por um reparo adequado, diminuição no número de leucócitos e osteoclastos em relação aos WT-A. Por outro lado, um atraso no reparo foi observado nos animais IL10KO, evidenciado por uma menor densidade de osteoblastos e de matriz óssea do que o respectivo controle. Em conclusão, os resultados mostraram que ambas citocinas interferem no reparo ósseo alveolar por meio de mecanismos que envolvem o controle da migração de células inflamatórias e modulação de quimiocinas e a expressão de marcadores osteogênicos, uma vez que a ausência de IL-10 está associada a uma maior atividade inflamatória e reabsorção óssea concomitante com menor formação óssea, já a deficiência de TNF- α afeta o recrutamento de leucócitos e a cinética de reparo óssea alveolar em condições homeostáticas e infecciosas.

Palavras-chaves: Citocinas. Regeneração óssea. Alvéolo seco.

ABSTRACT

Morphometric and molecular characterization of the role of pro- and anti-inflammatory cytokines in alveolar bone repair process under homeostatic and infectious conditions

Bone metabolism is influenced by endocrine, genetic and growth factors, RANK/RANKL/OPG system, besides a variety of regulatory molecules, such as cytokines. Cytokines have been implicated in pathogenesis of bone diseases, however, little is known about the mechanisms involved in the interaction between skeletal and immune system in the bone repair process. The objective of this study was characterized the role of TNF- α and IL-10 in alveolar bone repair under homeostatic (control [C]) and infectious (experimental alveolitis [A]) conditions in C57Bl/6 (WT), TNFp55KO and IL-10KO mice. After surgery, in infectious groups was induced by ischemia alveolitis the well and a suspension of pus. The maxillas were collected at 0h, 7, 14 and 21 days after extraction of the maxillary incisor for histologic, histomorphometric and molecular (RealTimePCR). In histomorphometric analysis parameters were measured clot, inflammatory cells, fibers, fibroblasts, blood vessels, bone matrix, osteoblast, osteoclast, and other space - the interstitial fluid and bone marrow. Molecular analysis (RealTimePCR) were quantified the expression of growth factors, bone markers and extracellular matrix, cytokines and chemokines involved in the process. The data were submitted to the OneWay ANOVA test followed by Tukey's multiple comparison test. The results showed that in WT-C initial clot formation (0 hours) with early expression of BMP2, BMP4, BMP7, and TGFb1 VEGFa who had gradual increase peaking in 7 days. The expression of TNF- α and IL10 also peaked at 7 days in parallel with leukocyte count, associated with CCL2, CCL5 and CXCL1. In late periods there were decrease of inflammation and markers osteoblastic / osteogenic increased. Induction of experimental alveolitis in WT resulted in a marked increase in expression of TNF- α accompanied by increased expression of CXCL1 and CCL5, increased leukocyte count and decreased of IL10 expression that peaked at 14d, besides prominent leukocyte infiltration and granulation tissue, as well as histological evidence of delayed bone repair. Negative impact of alveolitis was attenuated in TNFp55KO mice, characterized by appropriate repair rate, decreased of the number of leukocytes and osteoclasts that WT-A. On the other hand, a lessened repair was observed in IL10KO animals, evidenced by lower density of the density of osteoblasts and bone matrix than respective control. In conclusion, the results show that both cytokines interferes in alveolar bone repair through mechanisms that involve the control of inflammatory cell migration and modulation of chemokines and osteogenic markers expression, since that the absence of IL-10 is associated with higher inflammatory activity and bone resorption concomitant with lower bone formation, while the deficiency of TNF- α affect the recruitment of leukocytes and the kinetics of alveolar bone healing both in homeostatic and infectious conditions.

Key words: Cytokines. Bone regeneration. Dry Socket.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Camundongo das linhagens C57Bl/6-WT (a). Procedimento cirúrgico para realização da exodontia (b). Exodontia do incisivo direito superior (c). Alvéolo pós-exodontia (d). Imagem do incisivo superior direito extraído do camundongo evidenciando a curvatura acentuada (e).....49
- 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).....53
- Figura 3 - Imagens de reconstrução tridimensional (3D) por microtomografia (MicroCT, Software CTvox) de camundongos WT: maxilas sem exodontia e pós-exodontia nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias em condições não-infecciosas (homeostáticas, WT-Controle).....65
- Figura 4 - Fotomicrografia dos terços coronal (T2), médio (T4) e apical (T6) dos alvéolos de camundongos WT em condições não-infecciosas (homeostáticas, WT-Controle) após exodontia nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias. HE, aumentos de 10x e 40x.....69
- Figura 5 - Análise comparativa da densidade de volume (%) de diferentes parâmetros no reparo ósseo alveolar nos períodos experimentais de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós exodontia nos camundongos WT em condições homeostáticas (controle). Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. * $p < 0,05$ entre os períodos analisados no grupo WT-C. ○ Grupo WT-Controle72
- Figura 6 - Análise molecular do perfil geral da expressão gênica do processo de reparo ósseo alveolar em camundongos C57Bl/6 (WT). Análise por PCR Array (SABiosciences – QIAGEN), utilizando um painel customizado contendo alvos dos painéis “Wound Healing” (PAMM-121), “Inflammatory cytokines and receptors” (PAMM-011) e “Osteogenesis” (PAMM-026). Resultados descritos pelo aumento de vezes da expressão do mRNA a partir de medições triplicado em relação ao controle de amostras e normalizada inicialmente pelos controles endógenos *Gapdh*, *Hprt* e *Actb* utilizando o método de limiar de ciclo (Ct) e em seguida normalizados pelas amostras controle. Resultados expressos como “fold change” em relação aos controles. * indica valores estaticamente diferentes
-

entre o grupo indicado e o grupo controle, $p < 0,05$, Mann-Whitney com correção de Benjamini e Hochberg.	73
Figura 7 - Cinética de expressão de fatores de crescimento no reparo ósseo alveolar de camundongos C57Bl/6 WT – Controle (condições homeostáticas). Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão 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.....	75
Figura 8 - Cinética de expressão de marcadores de matriz extracelular no reparo ósseo alveolar de camundongos C57Bl/6 WT – Controle (condições homeostáticas). Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão 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	76
Figura 9 - Cinética de expressão de marcadores ósseos no reparo ósseo alveolar de camundongos C57Bl/6 WT – Controle (condições homeostáticas). Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão 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 10 - Cinética de expressão de quimiocinas no reparo ósseo alveolar de camundongos C57Bl/6 WT – Controle (condições homeostáticas). Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão 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.....	79
Figura 11 - Cinética de expressão de receptores de quimiocinas no reparo ósseo alveolar de camundongos C57Bl/6 WT – Controle (condições homeostáticas). Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão 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 12 - Cinética de expressão da citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e anti-inflamatória (IL-10) no reparo ósseo alveolar de camundongos C57Bl/6 WT – Controle (condições homeostáticas). Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão 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.....	81
Figura 13 - Fotomicrografia dos terços coronal (T2), médio (T4) e apical (T6) dos alvéolos de camundongos TNFp55KO em condições não-infecciosas (homeostáticas, TNFp55-Controle) após exodontia nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias. HE, aumentos de 10x e 40x.....	85
Figura 14 - Análise comparativa da densidade de volume de diferentes parâmetros no reparo ósseo alveolar nos períodos experimentais de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós exodontia nos camundongos WT e TNFp55KO em condições homeostáticas (controle). Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. # $p < 0,05$ diferença estatisticamente significativa entre as duas linhagens (WT vs TNFp55KO). ○ Grupo WT-Controle e □ Grupo TNFp55KO-Controle	88
Figura 15 - Cinética de expressão de marcadores ósseos e de matriz extracelular, citocinas e quimiocinas envolvidas no metabolismo ósseo no tecido alveolar de	

camundongos C57Bl/6 WT-C e TNFp55KO-C em condições homeostáticas	90
Figura 16 - Fotomicrografia dos terços coronal (T2), médio (T4) e apical (T6) dos alvéolos de camundongos IL10KO em condições não-infecciosas (homeostáticas, IL10KO - Controle) após exodontia nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias. HE, aumentos de 10x e 40x.....	93
Figura 17 - Análise comparativa da densidade de volume de diferentes parâmetros no reparo ósseo alveolar nos períodos experimentais de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós exodontia nos camundongos WT e IL10KO em condições homeostáticas (controle). Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. # $p<0,05$ diferença estatisticamente significativa entre as duas linhagens (WT vs IL10KO). ○ Grupo WT-Controle e Δ Grupo IL10KO-Controle.	96
Figura 18 - Cinética de expressão de marcadores ósseos e de matriz extracelular, citocinas e quimiocinas envolvidas no metabolismo ósseo no tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 WT-C e IL10KO-C em condições homeostáticas.	98
Figura 19 - Fotomicrografias dos terços coronal (T2), médio (T4) e apical (T6) dos alvéolos de camundongos WT em condições infecciosas (WT-Alveolite) após exodontia nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias. HE, aumentos de 10x e 40x.....	101
Figura 20 - Análise comparativa da densidade de volume de diferentes parâmetros no reparo ósseo alveolar nos períodos experimentais de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós exodontia nos camundongos WT em condições homeostáticas (WT-Controle) e infecciosas (WT-Alveolite). Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. * $p<0,05$ entre os grupos WT-C e WT-A. ○ Grupo WT-Controle e ● Grupo WT-Alveolite.....	104
Figura 21 - Cinética de expressão de quimiocinas envolvidas no reparo ósseo alveolar de camundongos C57Bl/6 WT em condições homeostáticas (WT-C) e infecciosas (alveolite experimental, WT-A). Amostras do tecido alveolar 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	106
Figura 22 - Cinética de expressão da citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e anti-inflamatória (IL-10) no reparo ósseo alveolar de camundongos C57Bl/6 WT em condições homeostáticas (Controle) e infecciosas (Alveolite). Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão 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.....	107
Figura 23 - Cinética de expressão de marcadores do metabolismo ósseo no tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 WT em condições homeostáticas e infecciosas submetidos à alveolite experimental. Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) 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-C e WT-A.....	109
Figura 24 - Cinética de expressão de marcadores de osteoclastos no tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 WT em condições homeostáticas e infecciosas e submetidos à alveolite experimental. Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) 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-C e WT-A.....	110

Figura 25 - Fotomicrografias dos terços médios (T4) dos alvéolos de camundongos WT, TNFp55KO e IL10KO em condições não-infecciosas (homeostáticas, Controle) pós-exodontia nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias. HE, aumentos de 10x e 40x.....	111
Figura 26 - Fotomicrografias dos terços médios (T4) dos alvéolos de camundongos WT, TNFp55KO, IL10KO em condições infecciosas (Alveolite) após exodontia nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias. HE, aumentos de 10x e 40x.....	113
Figura 27 - Análise comparativa da densidade de volume de diferentes parâmetros no reparo ósseo alveolar nos períodos experimentais de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós exodontia nos camundongos em condições homeostáticas WT-C e TNFp55KO-C, e infecciosas WT-A e TNFp55KO-A. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. $p < 0,05$ entre os grupos Controle e Alveolite da mesma linhagem, sendo * (WT-C vs WT-A) e ** (TNFp55KO-C vs TNFp55KO-A) e entre linhagens diferentes (WT vs TNFp55KO) # para o grupo Controle e ## para o grupo Alveolite. ○ Grupo WT-Controle; ● Grupo WT-Alveolite; □ Grupo TNFp55KO-Controle ■ Grupo TNFp55KO-Alveolite.....	117
Figura 28 - Análise comparativa da densidade de volume de diferentes parâmetros no reparo ósseo alveolar nos períodos experimentais de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós exodontia nos camundongos em condições homeostáticas WT-C e IL10KO-C, e infecciosas WT-A e IL10KO-A. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. $p < 0,05$ entre os grupos Controle e Alveolite da mesma linhagem, sendo * (WT-C vs WT-A) e ** (IL10KO-C vs IL10KO-A) e entre linhagens diferentes (WT vs IL10KO) # para o grupo Controle e ## para o grupo Alveolite. ○ Grupo WT-Controle; ● Grupo WT-Alveolite; △ Grupo IL10KO-Controle; ▲ Grupo IL10KO-Alveolite.....	120
Figura 29 - Análise comparativa da densidade de volume de diferentes parâmetros no reparo ósseo alveolar nos períodos experimentais de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós exodontia nos camundongos em condições homeostáticas WT-C, TNFp55KO-C e IL10KO-C, e infecciosas WT-A, TNFp55KO-A e IL10KO-A. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados.....	177

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	48
Tabela 2 - Relação dos genes analisados por PCR <i>Array</i>	57
Tabela 3 - Sequência de primers e propriedades de reação.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%:	Por cento
°C	Grau Celsius
µm:	Micrômetro
ACTB	Beta-actina (<i>Beta-actin</i>)
AHSG	Alfa-2-HS-glicoproteína (<i>Alpha-2-HS-glycoprotein</i>)
ALP	Fosfatase alcalina (<i>Alkaline phosphatase</i>)
AMBN	Ameloblastina (<i>Ameloblastin</i>)
APC	Célula apresentadora de antígeno (<i>antigen presenting cell</i>)
BMP	Proteína morfogenética óssea (<i>Bone morphogenetic protein</i>)
C57Bl/6-WT:	camundongo 57 black/6 (normal)
CCL	Quimiocina da família CC
CCR	Receptor de quimiocina da família CC
CD14	Receptor CD14 (<i>CD14 receptor</i>)
cDNA:	DNA complementar
CEEPA:	Comissão de Ética em Pesquisa com Animais
cm:	centímetro
COL1A2	Colágeno tipo I alfa 2 (<i>Collagen type I alpha 2</i>)
COL2a1	Colágeno tipo II alfa 1 (<i>Collagen type II alpha 1</i>)
COL4a2	Colágeno tipo IV alfa 2 (<i>Collagen type IV alpha 1</i>)
COL5a1	Colágeno tipo V alfa 1 (<i>Collagen type V alpha 1</i>)
COL-I:	colágeno do tipo I.
CT:	do inglês “cycle threshold”, traduzido como ciclo limiar.
CTSK	Catepsina k (<i>Cathepsin K</i>)
CXCL	Quimiocina da família CXC
CXCR	Receptor de quimiocina da família CXC
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos (<i>Damage-associated molecular patterns</i>)
DMP1	Proteína da matriz dentinária 1 (<i>Dentin matrix protein 1</i>)
DNA:	ácido desoxirribonucleico.
ECM :	matriz colagenosa extracelular.
EDTA	Ácido tetracético etilenodiamino (<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>)
EGF	Fator de crescimento epidermal (<i>Epidermal growth factor</i>)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
e-PTFE	Politetrafluoretileno expandido (<i>Expanded polytetrafluorethylene</i>)
et al.:	colaboradores.
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto (<i>Fibroblast growth factor</i>)

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	Grama
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)
H ⁺ :	íons ácidos.
HE	Hematoxilina e Eosina (<i>Hematoxylin and eosin</i>)
HPRT1	Hipoxantinafosforibosiltransferase1 (<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>)
IFN	Interferon (<i>Interferon</i>)
IFN- γ	Interferon-gama (<i>Interferon</i>)
IL	Interleucina (<i>Interleukin</i>)
IL-1 β	Interleucina-1 beta.
KO	Animal geneticamente modificado (<i>Knockout</i>)
LAL	Lisado de amebócito de limulus (Limulus amoebocyte lysate)
LPS	Lipopolissacarídeo (<i>Lipopolysaccharide</i>)
LTA	Ácido lipoteicoico (<i>Lipoteichoic acid</i>)
mg/kg:	miligramas por quilo.
min	Minuto
MIP-2:	do inglês “macrophage-inflammatory protein-2” traduzido como proteína inflamatória de macrófagos-2.
ml:	mililitros.
mm	Milímetro
MMP	Metaloproteinase de matriz (<i>Matrix metalloproteinase</i>)
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro (<i>Messenger ribonucleic acid</i>)
NF- κ B	Fator nuclear kappa B (<i>Nuclear factor kappa B</i>)
nm:	nanômetro.
OCN:	Osteocalcina.
OPG	Osteoprotegerina (<i>Osteoprotegerin</i>)
p:	nível de significância, probabilidade.
P:	número total de pontos existentes no retículo.
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos (<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS	Solução Salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
pH:	potencial hidrogeniônico.

PHEX	Endopeptidase neutra reguladora de fosfato (<i>Phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked</i>)
Pi:	estruturas consideradas.
PPRs	Receptores de reconhecimento de padrões (<i>Pattern-recognition receptors</i>)
Proc.:	Processo.
RANK	Receptor ativador do NF- κ B (<i>Receptor activator of NF-κB</i>)
RANKL	Ligante do receptor ativador do NF- κ B (<i>Receptor activator of NF-κB</i>)
RNA:	ácido ribonucléico.
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.
s	Segundo
SERPINE1	Inibidor de serino-proteases (<i>Serine protease inhibitor</i>)
SOST	Esclerostina (<i>Sclerostin</i>)
TGF- α	Fator de crescimento e transformação alfa (<i>Transforming growth factor alpha</i>)
TGF- β	Fator de crescimento e transformação beta (<i>Transforming growth factor beta</i>)
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase (<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>)
TLR	Receptores semelhantes a toll (<i>Toll-like receptors</i>)
TNF-R1	Receptor de TNF tipo 1 (<i>Tumor necrosis factor receptor 1</i>)
TNF-R2	Receptor de TNF tipo 2 (<i>Tumor necrosis factor receptor 2</i>)
TNFRSF1A/TNFR1:	receptor do fator de necrose tumoral 1.
TNFRSF1B/TNFR2:	receptor do fator de necrose tumoral 2.
TNF- α	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor necrosis factor alpha</i>)
TWIST1	Proteína Twist 1 (<i>Twist-related protein 1</i>)
VDR	Receptor de vitamina D (<i>Vitamin D receptor</i>)
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)
Vvi:	densidade em volume.
WT	Camundongo normais (sem alteração, “tipo selvagem” - <i>Wild-type</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	25
2	PROPOSIÇÃO	41
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1	Animais de experimentação.....	47
3.2	Procedimentos cirúrgicos.....	48
3.3	Alveolite Experimental	49
3.4	Coleta das amostras.....	50
3.5	Microtomografia Computadorizada (Micro-CT ou μ -CT)	51
3.6	Procedimentos Histotécnicos.....	51
3.7	Análise histológica e histomorfométrica.....	52
	3.7.1. Casualização da amostra	52
	3.7.2. Determinação da densidade de volume.....	53
	3.7.3. Critérios adotados na análise histomorfométrica	54
3.8	Extração de RNA e Transcrição Reversa	55
3.9	Reações de PCR <i>Array</i>	56
3.10	Reações de RealTimePCR.....	58
3.11	Análise Estatística	60
4	RESULTADOS	61
4.1	<u>Camundongos WT em condições homeostáticas (WT- Controle)</u>	63
	4.1.1 Microtomografia (Micro-CT ou μ -CT)	63
	4.1.2 Análise histológica da cinética do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos WT-Controle.....	67

4.1.3	Análise histomorfométrica do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em condições homeostáticas em camundongos WT-Controle.....	71
4.1.4	Análise molecular	73
4.1.4.1	Perfil geral da expressão gênica dos marcadores envolvidos no reparo ósseo alveolar	73
4.1.4.2	Análise da cinética de expressão de fatores de crescimento no processo de reparo ósseo alveolar	74
4.1.4.3	Análise da cinética de expressão de marcadores de matriz extracelular no processo de reparo ósseo alveolar	76
4.1.4.4	Análise da cinética de expressão de marcadores ósseos no processo de reparo ósseo alveolar	77
4.1.4.5	Análise da cinética de expressão de quimiocinas e seus receptores no processo de reparo ósseo alveolar	79
4.1.4.6	Análise da cinética de expressão de citocinas pró- e anti-inflamatórias no processo de reparo ósseo alveolar.....	81
4.2	Papel da citocina pró-inflamatória TNF- α na cinética do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em condições homeostáticas Camundongos WT (WT-Controle) e TNF(p55)KO (TNF-Controle):.....	82
4.2.1	Análise histológica comparativa da cinética do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em condições homeostáticas nos camundongos TNF-Controle (TNFp55KO-C) em relação aos WT-Controle (WT-C)	82
4.2.2	Análise histomorfométrica.....	87
4.2.3	Análise molecular.....	89
4.3	Papel da citocina anti-inflamatória IL-10 na cinética do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em condições homeostáticas Camundongos WT (WT-Controle) e IL10KO (IL10-Controle):.....	91
4.3.1	Análise histológica comparativa da cinética do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em condições homeostáticas nos camundongos IL10-Controle (IL10KO-C) em relação aos WT-Controle (WT-C).....	91
4.3.2	Análise histomorfométrica.....	95
4.3.3	Análise molecular.....	97
4.4	<u>Camundongos WT em condições homeostáticas (WT-Controle) e infecciosas (WT-Alveolite):</u>	<u>99</u>
4.4.1	Análise histológica da cinética do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos WT-Alveolite.....	99

4.4.2	Análise histomorfométrica.....	103
4.4.3	Análise molecular.....	105
4.4.3.1	Análise molecular da expressão de quimiocinas	105
4.4.3.2	Análise molecular da expressão de citocinas	106
4.4.3.3	Análise molecular da expressão de marcadores do metabolismo ósseo.....	108
4.4.3.4	Análise molecular da expressão de marcadores osteoclastogênicos	110
4.5	<u>Camundongos WT (WT-Alveolite) e TNFp55KO (TNF- Alveolite) em condições infecciosas (alveolite experimental):</u>	115
4.5.1	Análise histológica da cinética do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos TNF-Alveolite em relação aos WT-Alveolite.....	115
4.5.2	Análise histomorfométrica.....	116
4.6	<u>Camundongos WT (WT-Alveolite) e IL10KO (IL10- Alveolite) em condições infecciosas (alveolite experimental):</u>	118
4.6.1	Análise histológica da cinética do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos IL10-Alveolite em relação aos WT-Alveolite.....	118
4.6.2	Análise histomorfométrica.....	119
5	DISCUSSÃO	121
6	CONCLUSÕES	151
	REFERÊNCIAS	155
	APÊNDICES.....	173
	ANEXOS.....	179

1 Introdução e Revisão de Literatura

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O osso tem funções estruturais e mecânicas bem reconhecidas, sendo o principal componente do esqueleto, fornecendo rigidez, proteção aos órgãos vitais, apoio às estruturas do corpo, auxiliando a locomoção, além de alojar a medula óssea. O tecido ósseo é um componente do osso extremamente dinâmico e complexo. De origem mesenquimal, é considerado um tipo especializado de tecido conjuntivo, constituído basicamente por células osteogênicas, osteoclastos e uma matriz extracelular abundante e mineralizada. Mais do que suporte, o tecido ósseo tem função metabólica essencial, servindo como reservatório mineral, atuando como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, que são liberados de forma controlada mantendo constante a concentração desses íons nos fluídos corporais (Hadjidakis and Androulakis 2006; Datta, Ng et al. 2008).

Os osteoblastos são células que revestem a superfície da matriz óssea tendo como funções: secretar a matriz óssea orgânica (osteóide), regular sua biomineralização, e o recrutamento, diferenciação e ativação dos osteoclastos. No final da fase de formação óssea, os osteoblastos podem passar a um estado quiescente e permanecerem na superfície da matriz como células de revestimento, ou sofrerem apoptose, ou mesmo serem incorporados à matriz como osteócitos (Manolagas 2000; Sodek and McKee 2000; Dallas and Bonewald 2010; Bianco, Sacchetti et al. 2011).

Por muitos anos, o dinamismo desse tecido foi atribuído em sua maior parte aos osteoblastos com suas importantes funções, enquanto que os osteócitos eram simplesmente osteoblastos que se tornaram praticamente inativos e considerados como meras células passivas ao serem aprisionados dentro das lacunas ósseas e com funções restritas (Dallas and Bonewald 2010; Dallas, Prideaux et al. 2013; Jilka, Noble et al. 2013). Atualmente, já são consideradas fases celulares transitórias, caracterizadas pela expressão de diferentes marcadores, determinando subpopulações de células osteogênicas distintas como células osteoprogenitoras, pré-osteoblastos, osteoblastos, osteócito osteóide, osteócitos mineralizando, até osteócito maduro (Franz-Odenaal, Hall et al. 2006; Dallas and Bonewald 2010; Bianco, Sacchetti et al. 2011; Bonewald 2011).

As células osteoprogenitoras, apesar de serem encontradas na medula óssea, tem sua localização específica na porção do estroma, sendo células-tronco não-hematopoiéticas, mas de linhagem osteogênica (Bianco, Sacchetti et al. 2011). Os pré-osteoblastos, células ainda indiferenciadas, expressam marcadores também encontrados em células tronco mesenquimais como STRO-1, CD29, CD105 e CD166 (Bonewald 2011). Para a diferenciação em osteoblastos é necessária a expressão de Runx2 (Cbfa1) e Osterix, seguido pela produção de fosfatase alcalina e colágeno, para a produção de matriz osteóide (Katagiri and Takahashi 2002; Bonewald 2011). A osteocalcina é produzida por osteoblastos maduros e continua sendo expressa pelos osteócitos. Por algum mecanismo ainda não completamente esclarecido, algumas células designadas são incorporadas na matriz osteóide como osteócitos e estendem projeções dendríticas, estabelecendo ligações com células já incorporadas e com células na superfície do osso. Moléculas como E11/gp38 e MT1-MMP parecem desempenhar um papel na formação dos canálculos, enquanto que outras moléculas, tais como destrina e CapG regulam o citoesqueleto. PHEX, MEPE e DMP-1 regulam a biomineralização e o metabolismo mineral e FGF-23 regula a excreção renal de fosfato (Bonewald 2011). A esclerostina (*sclerostin*) é um marcador do osteócito maduro e um regulador negativo de formação óssea (Winkler, Sutherland et al. 2003; Poole, van Bezooijen et al. 2005; Bonewald 2011). ORP150 podem preservar a viabilidade desta célula no ambiente hipóxico (Bonewald 2011).

Mesmo inserido em lacunas, os osteócitos são células incrivelmente versáteis. Através dos canálculos na matriz óssea, essas células podem se comunicar entre si e com as demais células da superfície óssea. Nessa rede funcional, os osteócitos exercem um importante papel devido à sua capacidade de funcionarem como sensores de tensão e estresse, sinais importantes na manutenção da integridade da estrutura óssea (Burger, Klein-Nulend et al. 2003; Knothe Tate, Adamson et al. 2004; Franz-Odenaal, Hall et al. 2006). A ideia da possível influência dos osteócitos na remodelação óssea já existe há décadas. No entanto, até recentemente, havia pouca evidência funcional desse controle direto na diferenciação e atividade como um orquestrador de remodelação óssea por meio de regulação da atividade de osteoblastos e osteoclastos (Bonewald 2011; O'Brien, Nakashima et al. 2013). Os osteócitos regulam também o metabolismo mineral tanto do fosfato quanto disponibilizando cálcio pela remodelação da matriz perilacunar. Além disso, essas células podem atuar ainda como uma “glândula endócrina”

produzindo fatores solúveis que atingem não somente as células na superfície do osso, mas também outros órgãos distantes. (Bonewald 2011).

Já os osteoclastos, possuem características peculiares, pois diferente das demais células ósseas, originam-se a partir de uma célula-tronco hematopoiética da linhagem mielóide, a mesma que origina os monócitos-macrófagos. Dessa forma, pré-osteoclastos fusionam-se formando os osteoclastos, células grandes e multinucleadas. Quando ativados, os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea, pois aderidos firmemente à superfície óssea, formam um microambiente capaz de remover tanto componentes orgânicos pela liberação de collagenase e outras enzimas, quanto minerais pela secreção de ácido (íons H^+) (Sodek and McKee 2000; Teitelbaum 2000; Garlet, Cardoso et al. 2006).

A matriz óssea é composta por uma porção orgânica e inorgânica. O principal componente da matriz orgânica é o colágeno do tipo I (90%) e o restante (10%) é composto por um grande número de proteínas não-colagenosas, como as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), osteocalcina (OCN), osteonectina, osteopontina, sialoproteína óssea e diversas proteoglicanas. Essas proteínas não-colagenosas participam no processo de maturação e mineralização da matriz e podem regular a atividade funcional das células ósseas. A principal proteína não-colagenosa é a osteocalcina, que desempenha um papel na ligação de cálcio, estabilização da hidroxiapatita na matriz e regulação da formação óssea. Já a parte inorgânica da matriz óssea é composta pelos cristais de hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) depositados nas fibrilas colágenas (Sodek and McKee 2000; Bronckers, Engelse et al. 2001; Gersbach, Byers et al. 2004; Dimitriou, Tsiridis et al. 2005; Hadjidakis and Androulakis 2006).

O tecido ósseo é constantemente remodelado, 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 osteoclástica à neoformação óssea subsequente (Horowitz, Xi et al. 2001; Chan and Duque 2002; McCauley and Nohutcu 2002; Behl, Siqueira et al. 2008; Roschger, Paschalis et al. 2008; Lloyd, Yuan et al. 2009). Dessa forma, podem-se considerar as chamadas “Unidades multicelulares ósseas” (BMU), constituídas de células osteogênicas (formadoras), osteoclastos (de reabsorção óssea), que juntamente com as células progenitoras e células associadas como, células endoteliais, células nervosas, formam unidades especializadas em mediar a remodelação óssea

(Karsenty and Wagner 2002; Hadjidakis and Androulakis 2006). O delicado equilíbrio no balanço entre o processo de formação e reabsorção óssea é o que determina a integridade e a manutenção da homeostasia desse tecido, permitindo seu desenvolvimento e renovação sem alterações funcionais, além de manter sua capacidade de reparo (Horowitz, Xi et al. 2001; Chan and Duque 2002; McCauley and Nohutcu 2002; Behl, Siqueira et al. 2008; Roschger, Paschalis et al. 2008; Lloyd, Yuan et al. 2009).

Diante de uma lesão tecidual, em geral ocorre uma resposta inflamatória e imune com a finalidade de tentar restaurar a homeostase alterada. De maneira geral, o processo de reparo depende do tipo de tecido lesionado, da intensidade da lesão e da manutenção da estrutura prévia do tecido. Esse reparo pode ocorrer por regeneração ou cicatrização. Na regeneração, ocorre a substituição do tecido injuriado por componentes teciduais idênticos àqueles perdidos ou danificados (Schmidt-Bleek, Schell et al. 2012). O osso é um dos poucos órgãos que retém um alto potencial de regeneração ainda na vida adulta, devido à sua capacidade de remodelação (Dimitriou, Tsiridis et al. 2005; Giannoudis, Einhorn et al. 2007; Tsiridis, Upadhyay et al. 2007; Keramaris, Calori et al. 2008; Lin, Rios et al. 2011; Rodrigues, Cardoso et al. 2011). Dessa forma, fraturas ósseas e pequenos defeitos produzidos por patologia ou traumas, reparam-se após algum tempo com a produção de novo tecido ósseo no local, com características morfofuncionais semelhantes às do tecido ósseo original perdido (Dimitriou, Tsiridis et al. 2005; Phillips 2005; Tsiridis, Upadhyay et al. 2007; Ai-Aql, Alaghl et al. 2008). Entretanto, apesar de tal capacidade, defeitos mais extensos ou associados a certas alterações sistêmicas, apresentam um atraso no reparo, ou em alguns casos, nem são completamente reparados, mesmo após longos períodos (Comarck 1987). No caso de uma extração dentária, o reparo ósseo alveolar é um processo sequencial complexo e bem regulado, envolvendo diferentes tipos de células e tecidos de forma que a região onde havia o dente é preenchida por tecido ósseo (Korpi, Astrom et al. 2009; Lin, Rios et al. 2011).

O osso alveolar é uma estrutura de suporte dos dentes e que se desenvolve em conjunto com o processo da erupção. Entre os tecidos ósseos especializados, o osso alveolar é caracterizado por suas peculiaridades, tais como: a remodelação contínua respondendo rapidamente aos estímulos fornecidos pelos dentes e forças relacionadas, e o constante desafio microbiano característico do ambiente bucal.

Lesões osteolíticas e traumáticas de osso alveolar são altamente prevalentes. Um reparo ósseo efetivo seria o ideal esperado para restabelecer a arquitetura e funções originais do tecido, o que não é exatamente o resultado clínico usual verificado. Além disso, quantidade e a qualidade óssea são requisitos imprescindíveis para terapias regenerativas como a instalação de implantes osseointegrados. Dessa forma, busca-se uma melhor preservação do osso alveolar a fim de proporcionar um leito mais favorável à confecção de próteses implanto-suportadas e osteo-muco-suportadas; e até mesmo favorecer a osteogênese para a colocação de implantes de carga imediata pós-exodontia. Assim, uma ampla caracterização do modelo de reparo ósseo alveolar pode contribuir não somente como uma ferramenta importante para investigações específicas, mas também gerar conhecimentos básicos para futuras intervenções.

Em termos celulares, a sequência dos eventos histológicos que se sucedem no processo de reparo ósseo alveolar já foram previamente estudadas em humanos e outras espécies como macacos, cães e ratos (Bodner, Kaffe et al. 1993; Elsubeihi and Heersche 2004; Rodrigues 2007; Cardoso 2009; Poleti 2009). Imediatamente após a exodontia o alvéolo é completamente preenchido por coágulo sanguíneo, com a presença das plaquetas carregadas de diversos fatores de crescimentos, além de células inflamatórias. Rapidamente inicia-se a formação de uma rede de fibrina. Em seguida, ocorre gradualmente a invasão de fibroblastos que tem origem principalmente da diferenciação de células mesenquimais e mitose de fibroblastos preexistentes nos remanescentes do ligamento periodontal aderidos à parede alveolar. Simultaneamente, ocorre a proliferação de capilares sanguíneos que tem origem a partir de células endoteliais e o aparecimento transitório de focos de infiltrado inflamatório, caracterizando a formação de um tecido de granulação com a presença de grande número de fibroblastos e fibras. A neovascularização também é característica do processo, sendo que novos vasos sanguíneos podem ser identificados no tecido de granulação e incorporados ao tecido ósseo neoformado. À medida que ocorre o aumento de fibras colágenas, diminui a população celular e vasos sanguíneos, caracterizando a fase de maturação do tecido conjuntivo. Paralelamente à regressão do tecido conjuntivo, observa-se um aumento gradativo de osteoblastos e matriz óssea, seguido pela presença de osteoclastos responsáveis pela remodelação do tecido neoformado. O processo de reparo alveolar é considerado completo quando o alvéolo dental estiver totalmente

preenchido por trabéculas ósseas espessas com canais medulares bem definidos, além da crista óssea remodelada (Carano and Filvaroff 2003; Kanczler and Oreffo 2008; Schipani, Maes et al. 2009).

De forma geral, uma resposta inflamatória inicial é essencial para desencadear o processo de reparo, o que influencia significativamente as fases seguintes (Fukata, Vamadevan et al. 2009; Schroder and Tschopp 2010). De fato, mediadores da resposta imune inflamatória desempenham papéis importantes na modulação de cenários de reparo ósseo. Se por um lado, a presença exacerbada de fatores osteoclastogênicos é a principal causa da reabsorção óssea patológica, na quantidade ideal, esses mesmos fatores são fundamentais no processo de reparo ósseo, substituindo o osso primário por osso secundário (Mills and Simpson 2012). Estudos também demonstram que a inibição da resposta imune/inflamatória inicial (com anti-inflamatórios, mesmo os mais específicos como os não-esteroidais), influenciam de forma negativa os processos de reparo ósseo e a osseointegração (Jacobsson, Djerf et al. 1994; Takayanagi 2007; Kalyvas and Tarenidou 2008; Caetano-Lopes, Canhao et al. 2009). Essa inibição por anti-inflamatórios além de não ser específica, sua ação é mais restrita ao início do processo de reparo.

Atualmente, sabe-se que a interação entre os sistemas imunológico e esquelético ocorre basicamente pela ação de mediadores produzidos pelas células do sistema imune. Esses mediadores interferem no processo de remodelação óssea, de forma que mediadores inflamatórios inibem a atividade dos osteoblastos e potencializam a atividade dos osteoclastos, enquanto mediadores anti-inflamatórios apresentam efeito oposto (Garlet, Cardoso et al. 2006; Garlet, Cardoso et al. 2007). Neste contexto, a descoberta do sistema RANK/RANKL/OPG é o principal exemplo específico que caracteriza de forma interessante a interação entre os sistemas ósseo e imunológico. Esse sistema RANK/RANKL/OPG possui papéis específicos, composto por moléculas partilhadas por ambos sistemas ósseo e imunológico, o que resultou na vertente da imunologia denominada osteoimunologia (Lorenzo and Choi 2005; Takayanagi 2005; Rauner, Sipos et al. 2007; Takayanagi 2007; Behl, Siqueira et al. 2008; Datta, Ng et al. 2008; Herman, Kronke et al. 2008; Lorenzo, Horowitz et al. 2008; Takayanagi 2013).

A ligação do receptor RANK presente nos pré-osteoclastos com o seu ligante RANKL (ligante do receptor de ativação do fator nuclear *kappa* B) é responsável pela diferenciação e ativação de osteoclastos. Essa ligação pode ser inibida, uma

vez que o OPG (osteoprotegerina), um receptor solúvel tipo “*decoy*” se ligue ao RANKL impedindo a interação entre RANK e RANKL, inibindo assim a diferenciação dos osteoclastos e consequentemente o processo de reabsorção óssea. O fato de RANKL também ser produzido pelos linfócitos T ativados, desequilibra o balanço entre RANKL e OPG, normalmente mantido sob estrito controle pelos osteoblastos. De fato, em condições fisiológicas, os osteoblastos têm papel importante 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 (Teitelbaum 2000; Katagiri and Takahashi 2002; Garlet, Cardoso et al. 2006; Wada, Nakashima et al. 2006; Rauner, Sipos et al. 2007; Takayanagi 2007; Herman, Kronke et al. 2008; Lorenzo, Horowitz et al. 2008). Estudos recentes 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, Toraldo et al. 2007).

Apesar das evidências iniciais de interação dos sistemas imunológico e esquelético no processo de reparo ósseo, a maioria dos estudos na área da osteoimunologia geralmente focam mais nas condições inflamatórias crônicas osteolíticas e infecciosas (Takayanagi 2005; Lee, Kim et al. 2008; Caetano-Lopes, Canhao et al. 2009). Em geral, os aspectos da osteoimunologia no reparo ósseo são baseados em estudos do processo de reparo de fraturas (Gerstenfeld, Cho et al. 2003; Takayanagi 2005; Lee, Kim et al. 2008; Rundle, Wang et al. 2008; Caetano-Lopes, Canhao et al. 2009), que não pode ser integralmente extrapolado no contexto geral do reparo ósseo devido às suas particularidades como a ossificação endocondral (Devlin, Hoyland et al. 1997). Outro modelo de estudo interessante é o de calota craniana, uma vez que este ocorre por ossificação intramembranosa (Gerstenfeld, Cho et al. 2001). No entanto, mesmo assim, ainda não representa o que ocorre na cavidade oral que é constantemente desafiada pela presença de microrganismos.

O processo de reparo alveolar pode ser influenciado por fatores locais e sistêmicos. Um dos fatores que podem perturbar o processo de reparo ósseo alveolar é a alveolite, ou também conhecida como “alvéolo seco” ou “osteíte alveolar” (Blum 2002). Essa complicação pós exodontia, ainda muito frequente, leva

a um processo inflamatório exacerbado, caracterizado clinicamente por ausência total ou parcial de coágulo sanguíneo no alvéolo dental, sintomatologia dolorosa incontrolável com analgésicos, com ou sem odor fétido e presença de restos necróticos. Ainda há muitas divergências quanto às definições da doença, sua etiologia e seus critérios de diagnóstico e tratamento, de forma que o tratamento curativo ainda tem sido considerado um procedimento empírico. Essa dificuldade em estabelecer um tratamento específico e eficiente, deve-se à complexidade da etiopatogenia, ainda não completamente esclarecida, mas que sofre interferência de diversos fatores locais e sistêmicos. Dentre esses fatores, estudos clínicos e experimentais relatam o aumento local da atividade fibrinolítica como principal fator etiológico da alveolite (Blum 2002; Cardoso, Rodrigues et al. 2010). Além disso, evidências sugerem que existe uma interação entre o trauma local excessivo e invasão bacteriana. A contaminação alveolar é um fator importante para o início da alveolite (Cardoso, Rodrigues et al. 2010).

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 et al. 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 et al. 1976). Uma possível relação entre microrganismos anaeróbios (predominantes na pericoronarite) com a etiologia da alveolite também foi demonstrada (Nitzan, Sperry et al. 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 et al. 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, Raposo et al. 2002).

Por ser um dos fatores que retarda o processo de reparo alveolar, existe um interesse específico em conhecer a interferência da alveolite nos mecanismos

biológicos envolvidos no reparo ósseo, assim como, os efeitos de diferentes modalidades clínicas de tratamento. Além disso, a compreensão da alveolite, sua etiopatogenia e os mecanismos envolvidos, pode contribuir não apenas para sua prevenção e tratamento, mas também gerar conhecimentos básicos com ampla aplicação. O entendimento dos mecanismos de ação e a cinética de expressão de diferentes citocinas e moléculas do metabolismo ósseo, em condições inflamatórias e infecciosas, pode favorecer intervenções em diferentes patologias que atingem o tecido ósseo, tais como osteomielite, abscesso periapical, entre outras (Blum 2002; Torres-Lagares, Serrera-Figallo et al. 2005; Noroozi and Philbert 2009).

Citocinas são glicoproteínas ou polipeptídeos regulatórios de baixo peso molecular, que em resposta a inúmeros estímulos, são secretadas por linfócitos, células dendríticas, macrófagos e outros tipos de células da imunidade natural que medeiam as reações inflamatórias e imunológicas. Originalmente essas pequenas proteínas foram identificadas, descritas e denominadas de acordo com seu papel sobre células linfoides e hematopoéticas. Atualmente, sabe-se que elas apresentam uma gama de funções, atuando em atividades biológicas incluindo proliferação, desenvolvimento, diferenciação, inflamação, homeostase e reparo (Sabat 2010; Abbas, Lichtman et al. 2012). Dentre as citocinas incluem-se as interleucinas, quimiocinas, fatores estimuladores e inibidores de colônia e fatores de crescimento.

Uma das citocinas pró-inflamatórias, com importante papel no desenvolvimento da resposta imune inata e adaptativa, é o TNF- α (fator de necrose tumoral alfa). O TNF- α atua em várias etapas do mecanismo de recrutamento de leucócitos, induzindo a regulação de moléculas de adesão e a produção de quimiocinas e matriz de metaloproteínases (MMPs). Também regula a apresentação de antígeno e atividade bactericida de fagócitos (Pfizenmaier, Wajant et al. 1996; Dinarello 2000), bem como atuando como um importante componente regulador na remodelação óssea.

Inicialmente, a citotoxicidade induzida pelo TNF foi atribuída ao receptor p55 e a proliferação celular ao receptor p75 (Tartaglia, Weber et al. 1991). No entanto, posteriormente foi demonstrado que o receptor p75 poderia aumentar a morte celular induzida por p55 (Bigda, Beletsky et al. 1994). Atualmente, sabe-se que a maioria dos efeitos antimicrobianos e pró-inflamatórios do TNF- α são mediados pelo receptor p55 (TNF-R1), enquanto o receptor p75 (TNF-R2) age atenuando a resposta inflamatória.

De forma geral, a presença de produtos microbianos caracteristicamente ativam células residentes e inflamatórias, levando à produção de mediadores inflamatórios, tais como o TNF- α , uma citocina pró-inflamatória que atua como estímulo para migração de células inflamatórias ao local, resultando em maior densidade de infiltrado inflamatório (Garlet, Avila-Campos et al. 2005; Garlet, Cardoso et al. 2007; Nowzari, Botero et al. 2008; de Oliveira, Schwartz-Filho et al. 2009). O TNF- α desempenha papel crítico na resistência à infecção por diversos patógenos, contribuindo tanto para respostas imunes inatas quanto adaptativas. Esta citocina atua em diversas etapas dos 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 (Offenbacher, Odle et al. 1989; Graves and Jiang 1995; Jiang, Magli et al. 1999; Graves and Cochran 2003; Nowzari, Botero et al. 2008). Assim, o TNF- α apresenta papel essencial na iniciação e efetuação das respostas imune e inflamatória. Diversos estudos têm demonstrado que a expressão inadequada dessa citocina pode levar a um significativo dano colateral ao hospedeiro. De fato, TNF- α apresenta um evidente papel na patogênese de diversas doenças autoimunes e inflamatórias com comprometimento ósseo, como a artrite reumatóide e as doenças periodontais (Stashenko, Dewhirst et al. 1987; Ridderstad, Abedi-Valugerdi et al. 1991; Dinarello 2000; Gilbert, He et al. 2000; Henderson and Nair 2003; Garlet, Cardoso et al. 2007; Rauner, Sipos et al. 2007).

Os efeitos do TNF- α sobre as células ósseas são marcantes. O TNF- α reduz a formação óssea, atuando nas células precursoras dos osteoblastos, regulando, por exemplo, a expressão de RUNX2, inibindo assim a diferenciação osteoblástica (Gilbert, He et al. 2002; Dresner-Pollak, Gelb et al. 2004; Herman, Kronke et al. 2008; Lacey, Simmons et al. 2009). O TNF- α também atua sobre osteoblastos maduros, inibindo a síntese de osteocalcina e proteínas da matriz, como o colágeno tipo I (Gilbert, He et al. 2000; Gilbert, He et al. 2002). Tem sido sugerido ainda o efeito dessa citocina como potente pró-apoptótico, que por meio da sinalização do ligante Fas (FasL), regula a apoptose de osteoblastos (Behl, Siqueira et al. 2008; Lee, Kim et al. 2008). Além disso, o TNF- α atua sobre os osteoclastos, aumentando a reabsorção óssea. Assim, a perda óssea inflamatória é resultado da ação do TNF-

α sobre osteoblastos e osteoclastos (Gilbert, He et al. 2000; Gilbert, He et al. 2002; Katagiri and Takahashi 2002; Behl, Siqueira et al. 2008; Herman, Kronke et al. 2008; Lee, Kim et al. 2008; Lacey, Simmons et al. 2009). TNF- α também induz a mobilização de células precursoras de osteoclastos (monócitos) da medula óssea e sua migração para sítios de inflamação onde o TNF- α , junto com o RANKL, facilitam a fusão dos monócitos, resultando nos osteoclastos que reabsorvem a matriz óssea (Katagiri and Takahashi 2002; Behl, Siqueira et al. 2008; Herman, Kronke et al. 2008; Lee, Kim et al. 2008; Lorenzo, Horowitz et al. 2008).

Já a IL-10 é uma citocina com propriedades anti-inflamatórias, produzida por linfócitos T e B ativados, que reduz a expressão de moléculas co-estimulatórias em células apresentadoras de antígenos. Tal citocina está geralmente associada a uma significativa redução 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 da IL-10 também incluem a inibição da produção de fatores osteoclastogênicos, além de estimular a produção de seus respectivos antagonistas (Garlet 2004).

Como descrito para o TNF- α , a IL-10 têm 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, Gelb et al. 2004; Lee, Kim et al. 2008; Lorenzo, Horowitz et al. 2008). Além deste efeito direto, por ser uma potente citocina anti-inflamatória, a IL-10 pode modular a homeostase óssea indiretamente, pois, suprimindo a resposta inflamatória, inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , caracteristicamente osteoclastogênicas (Long, Hu et al. 2001; Al-Rasheed, Scheerens et al. 2004; Dresner-Pollak, Gelb et al. 2004; Monjo, Lamolle et al. 2008). E, uma vez que TNF- α inibe a diferenciação dos osteoblastos, a inibição dessa citocina pela IL-10, favorece indiretamente a formação óssea.

Estudos recentes também têm demonstrado que a ausência de IL-10 acelera a perda óssea periodontal (Al-Rasheed, Scheerens et al. 2003; Al-Rasheed, Scheerens 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, Gelb et al. 2004). 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 a 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 (Claudino, Garlet et al. 2010).

Assim, ao analisarmos em conjunto o papel antagônico de TNF- α e IL-10 no processo de reparo ósseo, estudos do nosso grupo (Garlet, Coelho et al. 2007) demonstraram uma distinta associação de tais citocinas com a remodelação do tecido ósseo durante a movimentação ortodôntica. A citocina pró-inflamatória TNF- α apresenta um efeito catabólico predominante, atuando como regulador positivo da osteoclastogênese e expressão de MMPs (Garlet, Coelho et al. 2007). Enquanto que a IL-10 tem propriedades anti-inflamatórias e de forma geral exerce um efeito inibitório que pode modular tanto a deposição quanto a degradação tecidual (Garlet, Coelho et al. 2007). Durante a movimentação dentária, após a aplicação da força ortodôntica, os níveis de TNF- α são maiores, o que favorece a reabsorção óssea. Estudos utilizando modelos animais confirmaram esses resultados demonstrando que a ausência de sinalização de TNF- α prejudica a movimentação dentária, ao contrário da IL-10, citocina anti-inflamatória, não detectada durante a movimentação ortodôntica em ratos. Estudos sugerem ainda uma expressão diferencial na remodelação óssea e do ligamento periodontal durante o tratamento ortodôntico, dessa forma, enquanto as áreas de compressão expressam altos níveis de TNF- α , as áreas de tensão expressam mais IL-10 (Garlet, Coelho et al. 2007).

Enfim, diversas evidências de estudos em humanos e modelos experimentais sugerem que citocinas como TNF- α e IL-10 apresentam papéis importantes no controle da homeostasia óssea em determinadas situações, além de exercerem um papel central na modulação do processo de reparo ósseo. Sabe-se que o processo de reparo é sequencial, complexo e firmemente regulado, envolvendo vários tipos de células, tecidos, fatores de crescimento e citocinas (Korpi, Astrom et al. 2009; Kuroda, Wazen et al. 2011). Entretanto, os diversos mecanismos imunológicos ligando tais citocinas ao reparo ósseo, tanto em condições homeostáticas, quanto infecciosas, ainda não estão totalmente esclarecidos. Neste contexto, o reparo ósseo alveolar pós exodontia pode representar um modelo experimental interessante e útil de reparo ósseo, permitindo o estudo de fatores envolvidos nesse

processo tanto em condições homeostáticas quanto em condições infecciosas, como no caso da alveolite.

2 Proposição

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi caracterizar o papel das citocinas pró e anti-inflamatórias (TNF- α e IL-10, respectivamente) no controle do reparo ósseo alveolar tanto em condições homeostáticas (reparo em condições normais), quanto infecciosas (alveolite experimental), em camundongos C57Bl/6, assim como investigar os mecanismos pelos quais tais citocinas exercem tal controle.

Mais especificamente, os objetivos deste estudo foram:

- Analisar a cinética do reparo ósseo alveolar em condições homeostáticas (controle) e infecciosas (alveolite experimental) em camundongos C57Bl/6 (WT) por meio da caracterização histológica (qualitativa) e histomorfométrica (quantitativa).
- Caracterizar molecularmente o processo de reparo ósseo alveolar em condições homeostáticas (controle) e infecciosas (alveolite experimental) em camundongos C57Bl/6 (WT), quantificando a expressão de fatores de crescimento, marcadores ósseos e de matriz extracelular, citocinas e quimiocinas potencialmente envolvidos nesse processo.
- Caracterizar o papel da citocina pró-inflamatória TNF- α no processo de reparo ósseo alveolar de forma comparativa entre camundongos das linhagens WT e TNFp55KO: em condições homeostáticas (controle), por meio de análise histológica, histomorfométrica e molecular; e em condições infecciosas (alveolite experimental), por meio de análise histológica e histomorfométrica.
- Caracterizar o papel da citocina anti-inflamatória IL-10 no processo de reparo ósseo alveolar de forma comparativa entre camundongos das linhagens WT e IL-10KO: em condições homeostáticas (controle), por meio de análise histológica, histomorfométrica e molecular; e em condições infecciosas (alveolite experimental), por meio de análise histológica e histomorfométrica.

3 Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais de experimentação

Foram utilizados ao todo 179 camundongos C57Bl/6 machos, com idade aproximada de 8 semanas, divididos em três linhagens diferentes (WT, IL10KO e TNFp55KO, Tabela 1). Os animais C57Bl/6 do tipo selvagem (*wild type* – WT, Figura 1) foram cedidos pelo biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP). Já os animais geneticamente modificados e deficientes (*knockouts*-KO) para o receptor p55 (TNF-R1) do TNF- α (TNFp55KO), e para o gene da citocina IL-10 (IL-10 KO) foram desenvolvidos em um fundo genético (background) de C57Bl/6J e fornecidos pelo Centro de Criação de Animais Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP). O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo (CEEPA – Proc. Nº 029/2009) (Anexos). 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, controle (C, condições homeostáticas) e alveolite experimental (A, condições infecciosas), e analisados de acordo com os diferentes períodos experimentais (0, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia, Tabela 1). 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 IL10KO-A, submetidos à alveolite experimental no período de 14 dias pós-exodontia, devido à dificuldade de obtenção dos mesmos (Tabela 1).

Todas as linhagens foram mantidas no biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP), sob as mesmas condições durante todo o período experimental. Todos os animais receberam água e alimentação sólida (Ração Ativada Produtor - Anderson & Clayton S.A.) *ad libitum*, com exceção das primeiras 24 horas após a cirurgia, em que a ração foi triturada. Os animais foram mantidos à temperatura de 23°C e período de claro-escuro de 12 horas.

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

Linhagem	Períodos	Divisão dos Procedimentos					Total
		Histologia, Histomorfometria e Micro-CT	Histologia e Histomorfometria		RealTime PCR		
			Controle	Controle	Alveolite	Controle	
C57Bl/6- WT	0h	1	4	5	4	4	18
	7d	1	4	5	4	4	18
	14d	1	4	5	4	4	18
	21d	1	4	5	4	4	18
TNFp55KO	0h	—	5	5	4	—	14
	7d	—	5	5	4	—	14
	14d	—	5	5	4	—	14
	21d	—	5	5	4	—	14
IL-10KO	0h	—	5	5	4	—	14
	7d	—	5	5	4	—	14
	14d	—	5	—	4	—	9
	21d	—	5	5	4	—	14
Total		4	56	55	48	16	179

3.2 Procedimentos cirúrgicos

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados via intramuscular com uma combinação de cloridrato de quetamina (2,32 mg/kg - Dopalen®, Agribrands do Brasil LTDA) e cloridrato de xilazina (0,46mg/kg - Anasedan®, Agribrands do Brasil LTDA), relaxante muscular e sedativo de uso animal, respectivamente.

Após a antisepsia 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 and de Russo 1973). Foi utilizada uma sonda exploradora devidamente afiada para desinserção dos tecidos moles e luxação do dente. Em seguida, com uma pinça previamente desgastada foi feita a apreensão e remoção do elemento dentário.

As cirurgias foram realizadas com o auxílio de um microscópio estereoscópico (DF Vasconcelos), localizado na sala de mesoscopia da disciplina de anatomia da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP), nos aumentos de 16x e 25x (Figura 1).

Figura 1. Camundongo das linhagens C57Bl/6-WT (a). Procedimento cirúrgico para realização da exodontia (b). Exodontia do incisivo direito superior (c). Alvéolo pós-exodontia (d). Imagem do incisivo superior direito extraído do camundongo evidenciando a curvatura acentuada (e).

3.3 Alveolite Experimental

Nos grupos alveolite (WT-A, TNFp55KO-A e IL10KO-A), após a exodontia, para a indução da alveolite experimental, inicialmente foi provocada a isquemia do alvéolo do dente recém-extraído, introduzindo durante 1 minuto um cone de papel absorvente (Sybon-Kerr, segunda série n. 30) 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 em nitrogênio líquido (D'Antonio 1984).

Nessa suspensão foram identificados por DNA checkerboard (Rodrigues 2007; Cardoso 2009; Rodrigues 2010) a presença dos seguintes microrganismos: *Capnocytophaga ochracea*, *Fusobacterium nucleatum ss nucleatum*, *Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus anginosus*, *Treponema socranskii* e *Streptococcus sanguis*. Esses microrganismos foram previamente associados a quadros de infecções osteolíticas orais (Nitzan, Sperry et al. 1978; Nitzan 1983; D'Antonio 1984; Mitchell 1986; de Melo Junior, Raposo et al. 2002; Baumgartner, Khemaleelakul et al. 2003; Socransky and Haffajee 2005). A utilização dessa suspensão de bactérias permite a padronização da infecção, uma vez que a mesma foi previamente utilizada com sucesso na indução de alveolite experimental em ratos (D'Antonio 1984; Carvalho 1989; Mariano 1991; Meira 1993; Mariano 1995). Essa metodologia foi também utilizada por nosso grupo de pesquisa (Rodrigues, Cardoso et al. 2011) e anteriormente em duas dissertações de mestrado (Rodrigues 2007; Cardoso 2009), em que obtiveram a indução de alveolite supurativa em todos os espécimes, caracterizada pela expressão de altos níveis de proteína C reativa, sinais clínicos de infecção supurativa, além de retardo no reparo alveolar.

3.4 Coletas de amostras

A eutanásia dos animais foi realizada ao término de cada período experimental (0 hora, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia), sob sedação e com injeção de dose excessiva de anestésico via intramuscular. As maxilas dos camundongos foram coletadas com o auxílio de um bisturi e lâmina n°15.

Do grupo WT em condições homeostáticas (WT-Controle) uma maxila de cada período (0 hora, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia) foi previamente fixada e destinada à obtenção de imagens pela técnica de microtomografia computadorizada (Micro-CT, Skyscan 1174) e posteriormente processadas para a técnica de rotina para inclusão em parafina e obtenção de cortes histológicos.

Como detalhado na Tabela 1, considerando todas as linhagens utilizadas (WT, TNFp55KO e IL10KO) e a divisão dos grupos em controle (condição homeostática) e alveolite experimental, de cada tempo (0h, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia), foram distribuídas 5 amostras para análises histológicas e 4 para as moleculares, de acordo com estudos realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa (Garlet, Cardoso et al. 2006; Garlet, Cardoso et al. 2007).

Após a coleta, as maxilas destinadas para as análises histológicas foram imediatamente fixadas em solução de formol 10% tamponado em PBS para posterior desmineralização e processamento histológico. Já para as análises moleculares foram desprezadas as demais áreas da maxila sendo coletada apenas a região do alvéolo, fragmentadas com auxílio de um cinzel, transferidas para um tubo “eppendorf” contendo Trizol (Invitrogen Life Technologies, EUA) e armazenadas a -70°C para posterior extração de RNA e análise da expressão gênica.

3.5 Microtomografia Computadorizada (Micro-CT ou μ -CT)

Com o intuito ilustrativo e complementar, de cada período experimental (0h, 7d, 14d e 21d) dos camundongos WT-Controle, foram separadas uma maxila para obtenção de imagens tridimensionais (3D) pela técnica de microtomografia computadorizada (Micro-CT, Skyscan 1174), como um recurso adicional para evidenciar melhor as áreas que seriam posteriormente analisadas por cortes histológicos.

O escaneamento das maxilas foi feito com 50 kV, 800 μ A, com filtro de 0,5 mmAl, com 180 graus de rotação e intervalo de exposição de 1 grau. O tempo de escaneamento foi de 33 minutos. As imagens foram capturadas com 1304 x 1024 pixels. A reconstrução feita com o software NRecon [Smoothing (4); Ring artifacts reduction (2); Beam-Hardening correction 15%]. Os parâmetros de reconstrução e escaneamento foram os mesmo usados para todas as amostras (0h, 7d, 14d e 21d). As imagens tridimensionais (3D) foram obtidas por meio do software CTvox. Posteriormente essas mesmas amostras foram então submetidas à descalcificação e ao processamento de rotina para inclusão em parafina e obtenção dos cortes histológicos para as análises histológica e histomorfométrica.

3.6 Procedimentos histotécnicos

Após a fixação em solução de formol 10% tamponado em PBS por 48 horas, as peças foram lavadas e em seguida desmineralizadas em solução de EDTA 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. Após a desmineralização as peças foram

lavadas em água destilada e em seguida, submetidas à técnica de rotina para inclusão em parafina Histosec® (parafina + resina). Utilizando um micrótomo (Leica Jung RM 2045) de cada bloco foram obtidos cortes semi-seriados no sentido látero-lateral (ou longitudinais) com 5 µm de espessura, com intervalo de 500 µm abrangendo assim todas as regiões do alvéolo: coronal (T2), média (T4) e apical (T6). Estes cortes foram corados em hematoxilina e eosina (HE) para posteriores análises.

3.7 Análise histológica e histomorfométrica

Para análise histológica descritiva (qualitativa) foi utilizado um microscópio óptico binocular (OLYMPUS, modelo CH-2), com objetivas de aumento de até 40x. Inicialmente, procedeu-se a análise morfológica por meio de uma descrição qualitativa dos três terços do alvéolo (coronal, médio e apical) dos diferentes períodos experimentais (0h, 7, 14 e 21 dias) nos diferentes grupos e linhagens.

Para análise histomorfométrica (quantitativa) foi utilizado um microscópio óptico binocular JENAMED 2 (Carl-Zeiss), com objetiva de 100x e auxílio de um retículo de integração II ZEISS. Nesta análise foi quantificada a densidade em volume de tecido ocupado por coágulo, fibras colágenas, fibroblastos, vasos sanguíneos, células inflamatórias, matriz óssea, osteoblastos e osteoclastos.

3.7.1 Casualização da amostra

De cada animal dos diferentes períodos experimentais (0h, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia) foi analisado pelo menos uma lâmina correspondente às diferentes regiões do alvéolo (coronal [T2], média [T4] e apical [T6]) abrangendo assim o reparo como um todo. Para a análise quantitativa, em cada lâmina foram considerados aleatoriamente pelo menos três cortes e em cada corte foi analisado toda a região do alvéolo, quantificando treze campos microscópicos distintos, sendo o primeiro campo localizado abaixo do epitélio gengival e o último próximo ao ápice da raiz (figura 2a).

Figura 2. Distribuição dos campos para análise de morfometria do alvéolo pós-exodontia (a) e retículo de integração (II ZEISS) de 100 pontos eqüidistantes (10x10) sobre a imagem de um corte histológico (b).

3.7.2. Determinação da densidade de volume

Foi utilizada uma objetiva de imersão com o aumento de 100x e uma lente ocular de compensação ZEISS kpl 8x, com um retículo de integração II ZEISS. O retículo de integração é uma grade composta por um quadrado que limita a área a ser estudada, e que contém um conjunto de 10 linhas paralelas sucessivas, divididas igualmente por 10 pontos, formando assim um sistema de 100 pontos equidistantes. A sobreposição do retículo sobre a imagem histológica permitiu a contagem de pontos presentes no retículo que coincidisse sobre as estruturas analisadas (figura 2b). 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).

3.7.3 Critérios adotados na análise histomorfométrica

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

1. Coágulo.
2. Células inflamatórias
3. Vasos sanguíneos.
4. Fibras colágenas: foram consideradas apenas as fibras colágenas, pois a coloração utilizada (Hematoxilina-Eosina, HE) não permite a diferenciação de outros tipos de fibras presentes no alvéolo.
5. Fibroblastos.
6. Matriz óssea.
7. Osteoblastos.
8. Osteoclastos.
9. Outros: este critério inclui a medula óssea e os espaços vazios correspondentes ao líquido intersticial e/ou exsudato inflamatório.

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.

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. Depois foi calculado a média e o desvio padrão dos percentuais obtidos nos animais pertencentes ao mesmo grupo.

3.8 Extrações de RNA e Transcrição Reversa

Para as análises moleculares foram desprezadas as demais áreas da maxila sendo coletada apenas a região do alvéolo dentário. As amostras foram fragmentadas com auxílio de cinzel (autoclavado e tratado com água DEPC), e transferidas para um tubo tipo “eppendorf” contendo Trizol.

A extração do RNA total dos fragmentos foi realizada por meio do 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 deixado à temperatura ambiente por 5 minutos. Para cada 1mL da suspensão foi adicionado 0,2ml de clorofórmio (Sigma) e centrifugadas a 13000 RPM por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa (camada superior) foi transferida para um tubo novo, ao qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol, agitado em “vortex” e incubado por 20 minutos a -20°C para precipitação do RNA da fase aquosa. Novamente os tubos foram centrifugados a 13000 RPM 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, utilizando uma transcriptase reversa (Kit de transcrição reversa - Superscript III, Invitrogen Life Technologies) e 5µg de RNA total; obtendo como volume final de reação 200µl.

Reações em cadeia da polimerase (PCRs) foram realizadas utilizando a enzima *Taq* polimerase (GIBCO Life Tech.) no termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA). As condições básicas da reação são 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 54°C e 2 minutos 72°C, acrescidos de um passo de extensão final de 7 minutos a 72°C. Todas as amostras também foram submetidas a reações para a detecção de RNA mensageiro para a beta-actina, um gene de

expressão constitutiva, utilizado como controle positivo da reação de amplificação. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das sequências dos primers utilizados. Os produtos de PCR foram submetidos eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e corados com nitrato de prata 0.2%.

3.9 Reações de PCR Array

A análise quantitativa prévia da expressão gênica da região dos alvéolos do grupo WT-Controle, foi analisada por meio de reações de PCR Array (SABiosciences – QIAGEN), utilizando um painel customizado contendo alvos dos painéis “Wound Healing” (PAMM-121), “Inflammatory cytokines and receptors” (PAMM-011) e “Osteogenesis” (PAMM-026). A listagem completa dos genes analisados, organizados em seus respectivos grupos, encontra-se na Tabela 2 e no Apêndice. De forma geral, esse sistema realiza as reações de amplificação e detecção e quantifica as amostras por meio de nucleases fluorogênicas utilizadas na reação, sendo tal expressão normalizada com base em controles endógenos. O DNA complementar sintetizado a partir do RNA mensageiro, juntamente com os demais reagentes do kit (SABiosciences – QIAGEN) foram misturados para a formação de um *mix*, contendo: 1250 µl do tampão 2X *SuperArray RT² qPCR Master Mix*; 100 µl de reação de síntese de cDNA; 1250 µl de água deionizada ‘DNAse/RNase free’ (Invitrogen, LifeTechnologies). Na sequência foram adicionados 25 µl desta mistura em cada poço da placa (96 poços), já contendo os pares de *primers* liofilizados. Em seguida, a reação de PCR em tempo real foi executada no aparelho da ABI7500, compreendendo basicamente 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, e quarenta e cinco ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cycle threshold – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos aonde a amplificação das amostras, atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras). Possibilitando assim, a análise quantitativa da expressão do fator avaliado, utilizando-se o *Software RT² Profiler PCR Array Data Analysis (SuperArray)*, que basicamente utiliza a fórmula $2^{(-DDCt)}$ para inicial normalização pela média geométrica de três genes constitutivos (Gapdh, Actb, Hprt1) e posteriormente normalizados pelo grupo controle, sendo expressos como

fold change em relação ao grupo controle. Genes apresentando valores de ciclo *threshold* (Ct) acima de 40 foram considerados não expressos. Para os ensaios de PCR Array foi utilizado um *pool* da região dos alvéolos dentários provenientes de camundongos WT do grupo controle (condições homeostáticas) dos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia.

Tabela 2. Relação dos genes analisados por PCR Array

Fatores de crescimento	<i>Bmp3, Bmp4, Bmp5, Bmp6, Bmp7, Egf, Fgf1, Fgf2, Fgf3, Tgfb1, Vegfa, Vegfb</i>
Marcadores ósseos	<i>Twist1, Alpl, Ahsg, Ambn, Dmp1, Phex, Sost, Vdr, Rankl, Opg, Rank, Ctsk</i>
Marcadores de matriz	<i>Col1a2, Col2a1, Col4a2, Col5a1, Mmp1a, Mmp2, Mmp8, Mmp9, Mmp10, Serpine1, Timp1, Timp3</i>
Citocinas	<i>Il1b, Il2, Il4, Il6, Il10, Il12, Il17, Ifng, Tnf</i>
Receptores de quimiocinas	<i>Ccr2, Ccr3, Ccr4, Ccr5, Ccr6, Ccr7, Ccr8, Ccr9, Cxcr1, Cxcr3</i>
Quimiocinas	<i>Ccl2, Ccl3, Ccl5, Ccl6, Ccl7, Ccl8, Ccl9, Ccl11, Ccl17, Ccl20, Ccl24, Ccl25, Cxcl1, Cxcl4, Cxcl5, Cxcl10, Cxcl11, Cxcl12, Cxcl13, Cx3cl1</i>
Controle	<i>Gapdh, Actb, Hprt1</i>

3.10 Reações de RealTimePCR

Confirmada a positividade da detecção de beta-actina por RT-PCR, bem como a integridade das amostras, foi realizada então a quantificação da expressão de mRNA por meio de reações de RealTimePCR, utilizando o sistema SYBRGreen em um aparelho ABI5700 (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), como previamente descrito (Garlet, Avila-Campos et al. 2005). No presente estudo, foram quantificados marcadores ósseos (osteocalcina [OCN], fosfatase alcalina [ALP], colágeno tipo I [COL-I], RUNX2/CBFA1, proteína morfogenética óssea [BMPs], 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) e outros genes como o VEGF.

Previamente às reações de RealTimePCR, os conjuntos de primers e sondas adequados para cada uma das reações de amplificação foram criados a partir de sequências de mRNA para os genes alvo, utilizando o programa Primer Express (Applied Biosystems). Na Tabela 3 estão descritos as sequências de primers, assim como as propriedades otimizadas de cada reação com relação às concentrações ideais de cada par de primers (temperatura de *annealing* e de *melting*, e tamanho do fragmento de amplificação), de modo a maximizar eficiência e a especificidade de amplificação.

Com o sistema utilizado (VIA7, Applied Biosystems by Life Technologies) as reações de amplificação e detecção, bem como a quantificação das amostras (MiniOpticon System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) foi dada por meio da análise do nível de fluorescência gerado pela incorporação nucleases fluorogênicas (SYBRGreen) aos produtos de amplificação durante o curso da reação no processo de amplificação de cada ciclo. Dessa forma, obteve-se a quantificação relativa da expressão dos alvos selecionados, sendo tal expressão normalizada com base em controles endógenos. 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 a 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 seqüências dos primers utilizados.

O DNA complementar sintetizado a partir do RNA mensageiro foi utilizado juntamente com reagentes SYBR Green, como determinado pelo fabricante. Foram utilizados 12,5µl do reagente SYBRGreen Master Mix (Applied Biosystems; que contém o fluoróforo SYBRGreen 1; a enzima polimerase AmpliTaq Gold; DNTPs com dUTP; e os demais componentes de tampão, já devidamente otimizados), 5µl da solução de cDNA (sintetizado como previamente descrito), 4µl de água MiliQ tratada com DEPC, e 1µl da solução contendo cada primer (a partir de uma solução stock, na qual cada primer se encontra na concentração de 1 µg/µl, foram preparadas alíquotas de modo a ajustar a concentração ideal de primer a ser utilizada em cada reação para o volume de 1µl). A reação de amplificação compreendeu 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 vinte minutos, com temperatura crescente de 60 a 95°C para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação.

Para as reações de RealTimePCR, foram utilizadas, independentemente, amostras de cDNA provenientes do RNA extraído da região dos alvéolos de 4 animais de cada linhagem e grupos (controle e alveolite), coletados de acordo com os tempos experimentais (0, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia). Os resultados apresentados representaram os valores da média $\pm$ SD, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina. Foram analisados os dados de três experimentos independentes.

Tabela 3. Sequência de primers e propriedades de reação.

Alvo	Sense e anti-sense	tA (°C)	tM (°C)	BP
TNF- α	AAGCCTGTAGCCCATGTTGT CAGATAGATGGGCTCATACC	56	79	330
IL-10	AGATC TCCGAGATGC CTTCA CCGTGGAGCAGGTGAAGAAT	58	85	307
OCN	CAAAGGTGCAGCCTTTGTGTC TCACAGTCCGGATTGAGCTCA	62	79	150
ALP	CGAGCAGGAACAGAAGTTTGC TGGCCAAAAGGCAGTGAATAG	61	83	200
OPG	GGAACCCAGAGCGAAATACA CCTGAAGAATGCCTCCTCACA	57	77	225
COL-I	AATCACCTGCGTACAGAACGG CAGATCACGTCATCGCACAAAC	61	84	114
CBFA1/RUNX2	TTCAAGGTTGACCCTCGGA AGATCGTTGAACCTGGCCACT	60	81	150
RANKL	CAGAAGATGGCACTCACTGCA CACCATCGCTTTCTCTGCTCT	65	73	203
VEGF	GCCCATGAAGTGGTGAAGTT ACTCCAGGGCTTCATCATTG	61	75	172
β -actina	ATGTTTGAGACCTTCAACA CACGTCAGACTTCATGATGG	56	75	495

At: temperatura de anelamento; Mt: temperature de melting; bp: pares de base, tamanho do amplicon.

3.11 Análise estatística.

Análises entre três ou mais tempos, como os dados relativos à análise morfométrica e os níveis de expressão de mRNA, foram submetidos ao teste estatístico de Análise de Variância one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. 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 Camundongos WT em condições homeostáticas (WT-Controle):

4.1.1 Microtomografia (Micro-CT ou μ -CT)

Com o intuito ilustrativo e complementar, de cada período experimental (0h, 7d, 14d e 21d) dos camundongos WT-Controle, foram separadas uma maxila para obtenção de imagens tridimensionais (3D) pela técnica de microtomografia computadorizada (Micro-CT, Figura 3), como um recurso adicional para evidenciar melhor as áreas que seriam posteriormente analisadas por cortes histológicos.

No período inicial de 0 hora, tanto no corte transversal (transaxial) quanto no longitudinal, foi observado na região do alvéolo uma área hipodensa, correspondente à presença do coágulo sanguíneo, e nenhuma estrutura hiperdensa no interior do alvéolo. As áreas hiperdensas observadas nesse período próximo ao alvéolo seriam sobreposição de estruturas adjacentes.

Aos 7 dias, tanto o corte transversal (transaxial) quanto o longitudinal, já evidenciavam áreas hiperdensas correspondente ao início da formação de trabéculas ósseas de maneira centrípeta, partindo das paredes laterais do alvéolo em direção ao centro. Essa formação centrípeta não foi evidente no corte histológico longitudinal que pode não ter sido precisamente no longo eixo do alvéolo. Também foi observada a presença do germe dental no corte longitudinal da microtomografia.

Aos 14 dias, tanto no corte transversal (transaxial) quanto no longitudinal, foi evidenciado uma formação óssea mais avançada com maior quantidade de trabéculas ósseas e já atingindo a região central do alvéolo. Também foi observada a presença do germe dental no corte longitudinal da microtomografia.

Aos 21 dias, tanto no corte transversal (transaxial) quanto no longitudinal, foi observado maior quantidade áreas hiperdensas correspondente à formação óssea mais avançada com presença de trabéculas ósseas mais espessas e ocupando praticamente toda a extensão do alvéolo. Nesse período também foi observado a presença do germe dental no corte longitudinal da microtomografia e com uma nova formação dentária um pouco mais avançada em relação aos períodos anteriores.

Figura 3. Imagens de reconstrução tridimensional (3D) por microtomografia (MicroCT, Software CTVox) de camundongos WT: maxilas sem exodontia e pós-exodontia nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias em condições não-infecciosas (homeostáticas, WT-Controle).

4.1.2 Análise histológica da cinética do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos WT-Controle

O reparo ósseo alveolar nos camundongos C57Bl/6 (WT) em condições homeostáticas (WT-Controle) foi analisado em cada terço do alvéolo, coronal ou superficial (região T2), médio (região T4) e apical (região T6). Embora tenham sido encontradas diferenças em relação à proporção das estruturas observadas, a cinética dos eventos em todos eles seguiu padrão semelhante.

No período inicial de 0 hora (*baseline*), imediatamente após a exodontia, o alvéolo foi completamente preenchido por coágulo sanguíneo nos três terços analisados com padrão similar entre eles. (Figura 4). Também foi observada a presença de algumas células inflamatórias; alguns espaços vazios deixados possivelmente pelo exsudato inflamatório, além da presença de alguns resquícios de ligamento periodontal encontrados principalmente no terço apical.

Com 1 dia pós exodontia (dados não mostrados) foi observado ainda grande quantidade de coágulo. Houve um aumento de células inflamatórias em relação ao período anterior (0 hora). Ainda foram observados alguns espaços vazios deixados possivelmente pelo exsudato inflamatório, além da persistência de alguns resquícios de ligamento periodontal encontrados principalmente no terço mais apical.

Aos 7 dias (Figura 4), ainda persistiu a presença de um remanescente de coágulo, mas em uma proporção bem menor quando comparado aos períodos anteriores e um aumento no infiltrado inflamatório. Também foi observado abundante tecido de granulação, com presença de pequenos vasos sanguíneos neoformados (angiogênese) e tecido conjuntivo inicialmente mais imaturo (matriz provisória) com grande quantidade de fibroblastos e matriz extracelular com delicadas (imaturas) fibras colágenas. Em algumas regiões já havia a presença de conjuntivo mais maduro com maior quantidade de fibras colágenas e um pouco mais espessas. Ainda nesse período (7 dias) foi observado neoformação óssea, com presença de osso primário (imaturo) com muitos osteoblastos recém-diferenciados e matriz óssea cujas fibras colágenas estão dispostas em várias direções e sem nenhuma organização definida e com maior proporção de osteócitos. A neoformação óssea ocorreu de maneira centrípeta, a partir dos bordos do alvéolo em direção à região central.

Aos 14 dias (Figura 4), ainda havia a presença de tecido conjuntivo mais maduro com fibras colágenas densas e desordenadas. A quantidade de trabéculas ósseas foi maior em relação ao período anterior (7 dias) e atingindo até mesmo a região central do alvéolo, com presença marcante de osteoclastos. Ainda nesse período foi observado um aumento na quantidade de vasos sanguíneos.

Já no período de 21 dias pós-exodontia (Figura 4), a quantidade de fibra e fibroblastos foi menor quando comparado aos períodos anteriores (7 e 14 dias) e restrito a pequenas áreas. A regressão do tecido conjuntivo foi acompanhada do aumento gradativo da área ocupada pelo tecido ósseo, com trabéculas mais espessas, menor quantidade de osteócitos, presença de alguns osteoclastos e regiões medulares. A maior quantidade de tecido ósseo foi evidenciado sobretudo na região média do alvéolo. Ainda nesse período a presença dos vasos sanguíneos foi bastante marcante.

Figura 4. Fotomicrografia dos terços coronal (T2), médio (T4) e apical (T6) dos alvéolos de camundongos WT em condições não-infecciosas (homeostáticas, WT-Controle) após exodontia nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias. HE, aumentos de 10x e 40x.

4.1.3 Análise histomorfométrica do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em condições homeostáticas em camundongos WT-Controle

Por meio da análise histomorfométrica foi possível quantificar nos animais WT-Controle a cinética do reparo ósseo alveolar nos diferentes períodos 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós exodontia. Dessa forma foi obtida a densidade de volume (%) das seguintes estruturas: coágulo sanguíneo, células inflamatórias, vasos sanguíneos, fibras colágenas, fibroblastos, matriz óssea, osteoblastos, osteoclastos e o parâmetro outros compreendendo a medula óssea ou espaços vazios possivelmente correspondentes ao fluido intersticial/exsudato inflamatório (Figura 5).

A análise histomorfométrica confirmou por meio da densidade de volume dos diferentes parâmetros, os dados observados na análise histológica. O coágulo teve seu pico no período inicial de 0 hora (Figura 5; $p < 0,05$), e posteriormente houve uma regressão significativa no período de 7 dias e que regrediu ainda mais no período de 14 dias e não foi mais evidenciado no período de 21 dias. A quantidade de células inflamatórias inicialmente pequena em 0 hora, teve seu pico aos 7 dias (Figura 5; $p < 0,05$), regredindo nos períodos posteriores (14 e 21 dias). No parâmetro “outros” foi quantificados os espaços vazios deixados possivelmente pelo exsudato inflamatório e nos períodos mais tardios regiões medulares. O tecido conjuntivo foi quantificado por meio de fibras e fibroblastos que tiveram seu pico aos 7 dias regredindo gradativamente nos demais períodos. A quantidade de vasos teve um aumento progressivo em todos os períodos (7, 14 e 21 dias). A formação óssea foi observada aos 7 dias e progrediu gradativamente atingindo seu pico aos 21 dias. A quantidade de osteoblastos foi significativa aos 7 dias, atingindo seu pico no período seguinte (14 dias) e regredindo aos 21 dias. A densidade de osteoclastos atingiu seu pico aos 14 dias (Figura 5; $p < 0,05$) com decréscimo aos 21 dias.

Figura 5 - Análise comparativa da densidade de volume (%) de diferentes parâmetros no reparo ósseo alveolar nos períodos experimentais de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós exodontia nos camundongos WT em condições homeostáticas (controle). Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. * $p < 0,05$ entre os períodos analisados no grupo WT-C. ○ Grupo WT-Controle

4.1.4 Análise molecular

4.1.4.1 Perfil geral da expressão gênica dos marcadores envolvidos no reparo ósseo alveolar

O perfil molecular da região do alvéolo dos diferentes períodos 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós exodontia dos camundongos C57Bl/6 WT do grupo controle (condições homeostáticas) foi investigado inicialmente por meio de uma análise exploratória por PCR Array (Figura 6). Dessa forma, foi utilizado uma matriz personalizada de qPCR contendo alvos pré-determinados possivelmente envolvidos no processo de reparo ósseo, tais como: fatores de crescimento, marcadores ósseos, marcadores de matriz extracelular, citocinas, receptores de quimiocinas e quimiocinas. Dessa forma, foi obtida uma média geral permitindo visualizar os alvos mais significativos a serem investigados de forma mais detalhada em análises posteriores.

Figura 6. Análise molecular do perfil geral da expressão gênica do processo de reparo ósseo alveolar em camundongos C57Bl/6 (WT). Análise por PCR Array (SABiosciences – QIAGEN), utilizando um painel customizado contendo alvos dos painéis “Wound Healing” (PAMM-121), “Inflammatory cytokines and receptors” (PAMM-011) e “Osteogenesis” (PAMM-026). Resultados descritos pelo aumento de vezes da expressão do mRNA a partir de medições triplicado em relação ao controle de amostras e normalizada inicialmente pelos controles endógenos *Gapdh*, *Hprt* e *Actb* utilizando o método de limiar de ciclo (Ct) e em seguida normalizados pelas amostras controle. Resultados expressos como “fold change” em relação aos controles. * indica valores estaticamente diferentes entre o grupo indicado e o grupo controle, $p < 0,05$, Mann-Whitne com correção de Benjamini e Hochberg.

Diante dos resultados obtidos pela análise prévia com o *PCR Array*, optamos por analisar por meio da técnica de RealTimePCR em cada período, o perfil de expressão de marcadores de formação óssea (osteocalcina [OCN], fosfatase alcalina [ALP], colágeno tipo I [COL1A1], RUNX2, proteína morfogenética óssea [BMP2], PHEX e DMP1); marcadores osteoclastogênicos (osteoprotegerina [OPG], catepsina K [CTSK] e RANKL); quimiocinas (CXCL1, CCL2 e CCL5); citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10), ao longo do processo de reparo alveolar pós-exodontia nos camundongos WT em condições homeostática (Controle).

Para uma melhor compreensão dos resultados moleculares, descreveremos, com maiores detalhes, os resultados obtidos em cada grupo de genes analisados.

4.1.4.2 Análise da cinética de expressão de fatores de crescimento no processo de reparo ósseo alveolar

Dentre as moléculas envolvidas no processo de reparo, encontra-se a superfamília do TGF- β (fator de crescimento transformador-beta) composta por fatores de crescimento e diferenciação, incluindo as BMPs (proteínas ósseas morfogenéticas); o próprio TGF- β ; dentre outros. Dentre os membros da família das BMPs, neste estudo analisamos a expressão das BMPs -2 a -7, e verificamos uma maior expressão de BMP-2, BMP-4, e BMP-7 (Figura 6). Também verificamos a expressão de outros fatores de crescimento como FGF-1 e FGF-2 e angiogênicos como VEGF. Em nosso estudo, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-7, TGF- β 1 e VEGFa tiveram seu pico de expressão aos 7 dias do reparo pós-exodontia (Figura 7). Já a expressão de BMP-6, FGF1 e FGF2 tiveram seu aos 14 dias do processo de reparo (Figura 7).

Figura 7. Cinética de expressão de fatores de crescimento no reparo ósseo alveolar de camundongos C57Bl/6 WT – Controle (condições homeostáticas). Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão 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.

4.1.4.3 Análise da cinética de expressão de marcadores de matriz extracelular no processo de reparo ósseo alveolar

Dentre os marcadores de matriz extracelular foram analisados o colágeno do tipo I e II, enzimas modificadoras da matriz extracelular como as metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores teciduais (TIMP). Analisamos a molécula COL-I (colágeno do tipo I), mais especificamente a expressão de Col1a1 e Col1a2, responsáveis por codificarem as cadeias de pró-colágeno (sendo duas cadeias de pró-colágeno $\alpha 1$ e uma cadeia de pró-colágeno $\alpha 2$, respectivamente) que juntas formam a estrutura de tripla hélice da molécula do colágeno tipo I. A expressão de Col1a1 e Col1a2 foram mais significativa nos períodos de 7 e 14 dias. Também foi analisada a expressão de Col2a1 que teve seu pico de expressão aos 14 dias. De todas as MMPs analisadas a mais expressiva foi a MMP-1. A expressão de MMP1a, MMP8, TIMP1 e TIMP3 que tiveram seu pico de expressão aos 7 dias. Já a MMP-2 teve uma expressão significativa aos 7 dias, mas só atingiu seu pico aos 14 dias do reparo.

Figura 8. Cinética de expressão de marcadores de matriz extracelular no reparo ósseo alveolar de camundongos C57Bl/6 WT – Controle (condições homeostáticas). Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão 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.

4.1.4.4 Análise da cinética de expressão de marcadores ósseos no processo de reparo ósseo alveolar

Em relação aos diferentes marcadores ósseos, analisamos a expressão de moléculas envolvidas na diferenciação e ativação de osteoblastos como o fator de transcrição de osteoblastos RUNX2 (CBFA-1) e marcadores de atividade osteoblástica precoce como a ALP (fosfatase alcalina) e tardio como a OCN (osteocalcina). Também foram analisadas moléculas envolvidas na sequencial transformação fenotípica de osteoblastos em osteócitos como PHEX e DMP1. Além dos marcadores de formação óssea, foram analisados também os marcadores osteoclastogênicos como o RANKL (ligante do receptor de ativação do fator nuclear kappa B) e OPG (osteoprotegerina), e de atividade osteoclástica como CTSK (catepsina K).

O Runx2, fator de transcrição essencial na diferenciação dos osteoblastos, teve uma expressão significativa aos 7 dias, atingindo seu pico aos 14 dias e regredindo posteriormente aos 21 dias. A análise da fosfatase alcalina (ALP), enzima responsável pela mineralização do tecido ósseo em formação, mostrou uma expressão significativa aos 7 dias, que foi mantida aos 14 dias, atingindo um pequeno pico aos 21 dias. Já a expressão de osteocalcina (OCN), marcador dos estágios mais avançados da diferenciação celular dos osteoblastos, teve uma expressão mais significativa a partir dos 14 dias, atingindo também um pequeno pico aos 21 dias. Expresso em quantidades diferentes, os marcadores da transformação fenotípica de osteoblastos em osteócitos PHEX e DMP1, apresentaram uma cinética de expressão semelhante, iniciando aos 7 dias, sendo mais expressiva aos 14 dias e também atingindo um pequeno pico aos 21 dias. Outro marcador analisado foi a amelobastina (Ambn), proteína que poderia estar envolvida na formação óssea porém sua expressão não foi significativa no processo de reparo. Dos marcadores osteoclastogênicos, a expressão de RANKL, ligante responsável pela diferenciação e ativação de osteoclastos, este teve uma expressão mais significativa aos 7 dias e que se manteve elevada aos 14 dias. Já a molécula OPG, um receptor solúvel “decoy” de RANKL, teve sua expressão mais elevada a partir dos 14 dias, mantendo-se ainda elevada aos 21 dias, que é fundamental para que haja um controle no processo de reabsorção óssea por meio do equilíbrio harmônico do sistema RANK/RANKL/OPG. A catepsina K, uma protease altamente expressa em

osteoclastos, e com papel essencial na reabsorção óssea, teve uma expressão significativa a partir dos 7 dias, atingindo seu pico aos 14 dias.

Figura 9. Cinética de expressão de marcadores ósseos no reparo ósseo alveolar de camundongos C57Bl/6 WT – Controle (condições homeostáticas). Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão 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.

4.1.4.5 Análise da cinética de expressão de quimiocinas e seus receptores no processo de reparo ósseo alveolar

Dentre os quimionas e os receptores de quimiocinas analisados, de forma geral aos 7 dias houve pico de expressão de CXCL1 (KC ou MIP-2 α) e CXCR1 associada a migração de neutrófilos; CCL1 associado à migração de monócitos e de outras quimionas como CCL3 (ou MIP-1 α) e CCL5 (ou RANTES) envolvidas no recrutamento de diferentes tipos de leucócitos, além da expressão de CCR4, CCR5 e CXCR3. Ao passo que CCR1, CCL2 (ou MCP-1) e seu receptor CCR2, também responsáveis pela quimioatração de diferentes leucócitos tiveram seu pico aos 14 dias, bem como a expressão de CCL17 no recrutamento de células T e de CX3CL1 no recrutamento de células T, NK e macrófagos.

Figura 10. Cinética de expressão de quimiocinas no reparo ósseo alveolar de camundongos C57Bl/6 WT – Controle (condições homeostáticas). Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão 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.

Figura 11. Cinética de expressão de receptores de quimiocinas no reparo ósseo alveolar de camundongos C57Bl/6 WT – Controle (condições homeostáticas). Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão 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.

4.1.4.6 Análise da cinética de expressão de citocinas pró- e anti-inflamatórias no processo de reparo ósseo alveolar

A análise das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e anti-inflamatória (IL-10) nos camundongos WT (WT-C), demonstraram um pico de expressão aos 7 dias do processo de reparo ósseo alveolar em condições homeostáticas, regredindo gradativamente nos períodos seguintes (14 e 21d, Figura 12). Como observado previamente pela análise de PCR Array (Figura 6) e confirmada posteriormente com esses resultados (Figura 12), de todas as citocinas analisadas as mais expressivas foram TNF- α e IL-10.

Figura 12. Cinética de expressão da citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e anti-inflamatória (IL-10) no reparo ósseo alveolar de camundongos C57Bl/6 WT – Controle (condições homeostáticas). Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão 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.

Diante dessas análises e da significativa expressão dessas citocinas pró- e anti-inflamatórias (TNF- α e IL10, respectivamente; Figuras 6 e 12) no processo de reparo ósseo alveolar em condições homeostáticas (Controle), investigamos a fundo o papel dessas citocinas utilizando camundongos geneticamente modificados (*Knockouts* - KO) comparados aos animais WT-Controle, cujos resultados serão descritos na sequência. Para analisar o papel do TNF- α utilizamos camundongos geneticamente deficientes do receptor p55 (TNF-R1) do TNF- α (TNFp55KO), por ser este o receptor responsável por maior parte dos efeitos pró-inflamatórios do TNF- α . E posteriormente para analisar o papel da IL-10 utilizamos camundongos geneticamente deficientes do gene da citocina IL-10 (IL-10KO).

4.2 Papel da citocina pró-inflamatória TNF- α na cinética do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em condições homeostáticas

Camundongos WT (WT-Controle) e TNF(p55)KO (TNF-Controle) em condições homeostáticas:

4.2.1 Análise histológica comparativa da cinética do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em condições homeostáticas nos camundongos TNF-Controle (TNFp55KO-C) em relação aos WT-Controle (WT-C)

Diante dos resultados moleculares do reparo ósseo alveolar em condições homeostáticas nos camundongos WT (WT-Controle), que demonstraram um aumento transitório na expressão da citocina pró-inflamatória TNF- α (Figura 12), analisamos então o processo de reparo na ausência dessa citocina, utilizando para

isso camundongos geneticamente modificados (*Knockout*) para não expressarem um dos receptores funcionais do TNF (p55KO).

A análise do reparo ósseo alveolar nos camundongos TNF(p55)KO em condições homeostáticas (TNF-Controle) seguiu padrão de cinética semelhante nos terços superficial ou coronal (região T2), médio (região T4) e apical (região T6) do alvéolo (Figura 13). No período inicial de 0 hora, imediatamente após a exodontia, o alvéolo foi completamente preenchido por coágulo sanguíneo, com presença de algumas células inflamatórias, além de alguns espaços vazios deixados possivelmente pelo exsudato inflamatório. Também foi observada a presença de alguns resquícios de ligamento periodontal encontrados principalmente no terço apical.

Aos 7 dias (Figura 13), ainda persistiu a presença de um remanescente de coágulo mais evidente do que nos camundongos WT Controle (Figura 4). Ainda nos animais TNFp55KO-C (Figura 13) houve um aumento no infiltrado inflamatório em relação ao tempo de 0 hora e aparentemente com presença de mais células inflamatórias que os animais WT-C. Também foi observada no grupo TNFp55KO-C a presença do tecido de granulação, com vasos sanguíneos neoformados e tecido conjuntivo caracterizado pelos fibroblastos e matriz extracelular rica em fibras colágenas. Ainda nesse período (7 dias) foi constatada o início da neoformação óssea a partir dos bordos do alvéolo em direção à região central, mas proporcionalmente menor do que no grupo WT-C (Figura 4).

Aos 14 dias, nos camundongos TNFp55KO-C (Figura 13) foi observado maior quantidade de vasos sanguíneos e osteoclastos em relação ao tempo de 7 dias. Ainda em comparação ao período anterior (7 dias, Figura 13), aos 14 dias havia menor quantidade de tecido conjuntivo, porém mais abundante do que em relação ao mesmo período (14 dias) nos animais WT-Controle (Figura 4). Ainda no grupo TNFp55KO-C foi evidenciado maior quantidade de trabéculas ósseas em relação ao tempo anterior de 7 dias e já atingindo até mesmo a região central do alvéolo. Nesse período (14 dias) a diferença na quantidade de tecido ósseo encontrada nos animais TNFp55KO-C (Figura 13) e WT-C (Figura 4) já não foi tão discrepante quanto a observada entre as duas linhagens no período anterior (7 dias).

Já aos 21 dias de reparo (Figura 13), houve uma pequena redução do tecido conjuntivo e em algumas regiões já era notável a presença de trabéculas ósseas um pouco mais espessas em relação ao período anterior de 14 dias, mas não tão

espessas quanto as observadas nos animais WT-C (21 dias, Figura 4). Também foi observada a presença dos vasos sanguíneos, alguns poucos osteoclastos e poucas regiões medulares.

Figura 13. Fotomicrografia dos terços coronal (T2), médio (T4) e apical (T6) dos alvéolos de camundongos TNFp55 em condições não-infecciosas (homeostáticas, TNFp55-Controle) após exodontia nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias. HE, aumentos de 10x e 40x.

4.2.2 Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica confirmou por meio da densidade de volume dos diferentes parâmetros, os dados observados na análise histológica. Semelhante à cinética apresentada pelos WT-Controle, nos camundongos TNFp55KO-C o coágulo teve seu pico no período inicial de 0 hora, e posteriormente houve uma regressão significativa no período de 7 dias, que regrediu ainda mais no período de 14 dias, não sendo mais evidenciado no período de 21 dias. Não houve diferença estatística na densidade de volume de coágulo nos animais TNFp55KO-C quando comparado aos WT-Controle. Já a quantidade de células inflamatórias teve seu pico aos 7 dias ($p < 0,05$, Figura 14), regredindo nos períodos posteriores (14 e 21 dias). Foi observada uma tendência à maior densidade de leucócitos em todos os períodos (0 hora, 7, 14 e 21 dias, Figura 14) do grupo TNFp55KO-C em relação aos WT-Controle, no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa. No parâmetro “outros”, correspondente aos espaços vazios deixados pelo exsudato inflamatório e nos períodos mais tardios às regiões medulares, a cinética foi semelhante à apresentada pelo grupo WT-Controle e não houve diferença entre os animais WT e TNFp55KO.

O tecido conjuntivo foi quantificado por meio de fibras e fibroblastos, em ambos parâmetros a cinética foi semelhante à dos WT-Controle com pico aos 7 dias regredindo gradativamente nos demais períodos. Em relação às fibras não houve diferenças estatísticas entre os WT-C e TNFp55KO, o mesmo não ocorreu em relação aos fibroblastos que apresentaram maior densidade de volume nos TNFp55KO em relação aos WT-C nos períodos de 14 e 21 dias ($p < 0,05$, Figura 14). Já em relação à densidade de volume dos vasos, a cinética entre os grupos foi diferente com uma diminuição na quantidade de vasos aos 21 dias nos animais TNFp55-C em relação aos 14 dias.

O parâmetro mais significativo foi em relação à densidade de volume da matriz óssea. Em ambas linhagens (WT-C e TNFp55KO-C) a cinética de formação óssea foi a mesma, atingindo seu pico aos 21 dias, mas com uma tendência à menor quantidade de tecido ósseo nos TNFp55KO-C quando comparados aos WT-C nos períodos de 7d, 14d e 21d, mas cuja redução só foi de fato estatisticamente significativa apenas aos 7 e 14 dias ($p < 0,05$, Figura 14).

Não houve diferença estatística na quantidade de osteoblastos TNFp55-C em relação aos WT-C, apenas uma tendência à menor quantidade de osteoblastos em

relação aos WT. Em relação aos osteoclastos observou-se um pico aos 14 dias com decréscimo aos 21 dias e apenas uma tendência à menor densidade de volume de osteoclastos nos TNFp55-C quando comparado aos WT-C no período de 21 dias.

Figura 14. Análise comparativa da densidade de volume de diferentes parâmetros no reparo ósseo alveolar nos períodos experimentais de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós exodontia nos camundongos WT e TNFp55KO em condições homeostáticas (controle). Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. # $p < 0,05$ diferença estatisticamente significativa entre as duas linhagens (WT vs TNFp55KO). ○ Grupo WT-Controle e □ Grupo TNFp55KO-Controle.

4.2.3 Análise molecular

Os grupos WT-Controle e TNFp55KO-Controle apresentaram perfis de expressão gênica similares, durante o processo de reparo ósseo alveolar. 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 em ambos grupos controles (dados não mostrados). Posteriormente, houve o aparecimento transitório de focos de infiltrado inflamatório, associados com a citocina pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 que atingiram seu pico máximo no período de 7 dias pós-exodontia (dados não mostrados), assim como as quimiocinas CCL5 e CXCL1, enquanto a citocina anti-inflamatória IL-10 e a quimiocina CCL2 ($p < 0,05$, Figura 15) tiveram 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. Com relação à expressão de marcadores ósseos (COL1A1, RUNX2, OCN, ALP, PHEX e DMP1) houve uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$, Figura 15) nos animais TNFp55KO em relação aos WT-C, ao longo do reparo ósseo desde o período de 7 a 21 dias pós-exodontia.

Figura 15. Cinética de expressão de marcadores ósseos e de matriz extracelular, citocinas e quimiocinas envolvidas no metabolismo ósseo no tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 WT-C e TNFp55KO-C em condições homeostáticas.

4.3 Papel da citocina anti-inflamatória IL10 na cinética do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em condições homeostáticas

Camundongos WT (WT-Controle) e IL10KO (IL10-Controle) em condições homeostáticas:

4.3.1 Análise histológica comparativa da cinética do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em condições homeostáticas nos camundongos IL10-Controle (IL10KO-C) em relação aos WT-Controle (WT-C)

Uma vez que os resultados moleculares do reparo ósseo alveolar em condições homeostáticas nos camundongos WT (WT-Controle) também demonstraram um aumento transitório na expressão da citocina anti-inflamatória IL10, analisamos então o processo de reparo na ausência dessa citocina, utilizando camundongos geneticamente modificados (*Knockout*) para não expressarem o receptor para IL10 (IL10KO).

A análise do reparo ósseo alveolar nos camundongos IL10KO em condições homeostáticas (IL10-Controle) seguiu padrão de cinética semelhante nos terços superficial ou coronal (região T2), médio (região T4) e apical (região T6) do alvéolo (Figura 16). No período inicial de 0 hora, imediatamente após a exodontia, o alvéolo foi completamente preenchido por coágulo sanguíneo, com presença de algumas células inflamatórias, além de alguns espaços vazios deixados possivelmente pelo exsudato inflamatório. Também foi observada a presença de alguns resquícios de ligamento periodontal encontrados principalmente no terço apical.

Aos 7 dias (Figura 16), ainda persistiu a presença de um remanescente de coágulo bem mais evidente do que nos camundongos WT Controle (WT-C, Figura 4). Também houve um aumento expressivo na quantidade de células inflamatórias nos animais IL10KO (Figura 16) em relação aos animais WT-C (Figura 4). Nos IL10-KO ainda foi observado a presença do tecido de granulação, com vasos sanguíneos neoformados e abundante tecido conjuntivo caracterizado pelos fibroblastos e matriz extracelular rica em fibras colágenas. Ainda nesse período (7 dias, Figura 16) foi constatado o início da neoformação óssea a partir dos bordos do alvéolo em direção à região central, mas proporcionalmente menor do que no WT-C (Figura 4).

Aos 14 dias (Figura 16), nos camundongos IL10KO foi observado menor quantidade de tecido conjuntivo, porém mais abundante do que em relação ao mesmo período (14 dias) nos animais WT-Controle (Figura 4). Ainda no grupo IL10KO-C foi evidenciado maior quantidade de trabéculas ósseas em relação ao tempo anterior de 7 dias e já atingindo até mesmo a região central do alvéolo. Nesse período (14 dias) a diferença na quantidade de tecido ósseo encontrada nos animais IL10KO-C (Figura 16) e WT-C (Figura 4) já não foi tão discrepante quanto a observada entre as duas linhagens no período anterior (7 dias). Aos 14 dias, nos camundongos IL10KO-C (Figura 16) foi observado maior quantidade de vasos sanguíneos em relação ao tempo de 7 dias e presença marcante de osteoclastos.

Aos 21 dias (Figura 16), houve uma redução do tecido conjuntivo e em algumas regiões já era notável a presença de trabéculas ósseas um pouco mais espessas em relação ao período anterior de 14 dias, mas não tão espessas quanto as observadas nos animais WT-C (21 dias, Figura 4). Nos períodos finais de 14 e 21 dias, proporcionalmente a formação óssea foi menor quando comparado os camundongos IL10KO (Figura 16) em relação aos WT-C (Figura 4). Também foi observada a presença dos vasos sanguíneos, alguns osteoclastos e regiões medulares.

Figura 16. Fotomicrografia dos terços coronal (T2), médio (T4) e apical (T6) dos alvéolos de camundongos IL10KO em condições não-infecciosas (homeostáticas, IL10KO - Controle) após exodontia nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias. HE, aumentos de 10x e 40x.

4.3.2 Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica confirmou por meio da densidade de volume dos diferentes parâmetros, os dados observados na análise histológica. Semelhante à cinética apresentada pelos WT-Controle, nos animais IL10KO o coágulo teve seu pico no período inicial de 0 hora. Aos 7 dias, nos camundongos IL10KO-C ainda persistiu a presença de um remanescente de coágulo com densidade de volume estatisticamente maior que a encontrada nos WT Controle ($p < 0,05$, Figura 17). No período seguinte (14 dias) houve uma regressão significativa desse coágulo que não foi mais evidenciado no período de 21 dias (Figura 17).

No parâmetro das células inflamatórias observou-se uma tendência à maior densidade de volume em todos os períodos quando comparado a linhagem IL10KO-Controle com os WT-Controle. No entanto, só foi constatado uma diferença estatisticamente significativa no pico do infiltrado inflamatório aos 7 dias ($p < 0,05$, Figura 17), regredindo nos períodos posteriores (14 e 21 dias). No parâmetro “outros”, correspondente aos espaços vazios deixados pelo exsudato inflamatório e nos períodos mais tardios às regiões medulares, a cinética foi semelhante à apresentada pelo grupo WT-Controle e não houve diferença entre os animais WT e IL10KO.

O tecido conjuntivo foi quantificado por meio de fibras e fibroblastos, em ambos parâmetros a cinética foi semelhante à dos WT-Controle com pico aos 7 dias regredindo gradativamente nos demais períodos. A linhagem IL10KO-C mostrou uma tendência a maior densidade de volume de fibras em relação ao WT-C, mas que não foi estatisticamente (Figura 17). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos IL10KO-C e WT-C na densidade de volume dos vasos, que seguiu uma cinética semelhante à encontrada nos WT-C com um aumento progressivo na quantidade de vasos ao longo dos períodos (7, 14 e 21 dias).

Com relação à densidade de volume de matriz óssea, a cinética de formação óssea foi semelhante em ambos grupos (WT-C e IL10KO-C) atingindo seu pico aos 21 dias, mas com menor densidade de volume de matriz óssea nos IL10KO-C quando comparados aos WT-C nos períodos de 7d, 14d e 21d ($p < 0,05$, Figura 17).

A densidade de volume de osteoblastos foi menor na linhagem IL0-C em relação aos WT-C ($p < 0,05$, Figura 17). Já na quantificação dos osteoclastos a densidade de volume foi estatisticamente maior nos IL10KO no pico de 14 dias quando comparado aos animais WT-C ($p < 0,05$, Figura 17).

Figura 17. Análise comparativa da densidade de volume de diferentes parâmetros no reparo ósseo alveolar nos períodos experimentais de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós exodontia nos camundongos WT e IL10KO em condições homeostáticas (controle). Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. # $p < 0,05$ diferença estatisticamente significativa entre as duas linhagens (WT vs IL10KO). ○ Grupo WT-Controle e △ Grupo IL10KO-Controle.

4.3.3 Análise molecular

De maneira geral, os grupos WT-Controle e IL10KO-Controle 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 em ambos grupos controles. Posteriormente, houve o aparecimento transitório de focos de infiltrado inflamatório, associados com a citocina 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 ($p<0,05$), 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. Com relação à expressão de marcadores do metabolismo ósseo (COL1A1, RUNX2, OCN, ALP, PHEX e DMP1) houve uma redução estatisticamente significativa ($p<0,05$) nos animais IL10KO em relação aos WT.

Figura 18. Cinética de expressão de marcadores ósseos e de matriz extracelular, citocinas e quimiocinas envolvidas no metabolismo ósseo no tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 WT-C e IL10KO-C em condições homeostáticas.

4.4 Camundongos WT em condições homeostáticas (WT-Controle) e infecciosas (WT-Alveolite):

4.4.1 Análise histológica da cinética do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos WT-Alveolite

Compreendido o processo de reparo em condições homeostáticas com a caracterização histológica e molecular, adaptamos um modelo de infecção experimental dos alvéolos, mimetizando um quadro de alveolite. Dessa forma buscamos estabelecer uma condição inflamatória e infecciosa, que caracteristicamente resultasse em exacerbada resposta imune e inflamatória local com o intuito de ampliar o foco de investigação do processo de reparo ósseo alveolar.

Apesar da indução da alveolite experimental, os animais WT-Alveolite (Figura 19) apresentaram uma cinética de reparo ósseo não foi muito diferente da observada no grupo controle (WT-Controle, Figura 4). A análise do reparo ósseo alveolar nos camundongos C57Bl/6 (WT) em condições infecciosas (WT-Alveolite) seguiu padrão de cinética semelhante nos terços superficial ou coronal (região T2), médio (região T4) e apical (região T6) do alvéolo. Após a exodontia, realizada a indução da isquemia e infecção do alvéolo, no período inicial de 0 hora, o alvéolo ainda mostrou-se completamente preenchido por coágulo sanguíneo, com presença de algumas células inflamatórias, além de alguns espaços vazios deixados possivelmente pelo exsudato inflamatório, semelhante ao encontrado nos camundongos WT-Controle (Figura 4). Também foi observada a presença de alguns resquícios de ligamento periodontal encontrados principalmente no terço apical (Figura 19).

Aos 7 dias, ainda persistiu a presença de um remanescente de coágulo mais acentuado, principalmente nos terços médio e apical do alvéolo dos animais WT-Alveolite (Figura 19) do que no grupo WT-Controle (Figura 4). O infiltrado inflamatório também mostrou-se mais abundante nos camundongos infectados (WT-A, Figura 19) em relação aos WT-Controle. Também foi observada a presença do tecido de granulação bem proeminente, com vasos sanguíneos neoformados e tecido conjuntivo caracterizado pelos fibroblastos e matriz extracelular rica em fibras colágenas. Nesse período (7 dias, Figura 19) a neoformação óssea iniciada a partir

dos bordos do alvéolo em direção à região central, aparentemente foi menor que a do WT-Controle (Figura 4), no entanto essa pequena diferença observada na análise descritiva não foi estatisticamente significativa nos dados histomorfométricos (Figura 21).

Aos 14 dias (Figura 19), nos camundongos WT-Alveolite foi observado menor quantidade de tecido conjuntivo, porém mais abundante do que em relação ao mesmo período (14 dias) nos animais WT-Controle (Figura 4). Ainda no grupo infectado (WT-A, Figura 19) foi evidenciado maior quantidade de trabéculas ósseas em relação ao tempo anterior de 7 dias e já atingindo até mesmo a região central do alvéolo. Nesse período (14 dias) a diferença na quantidade de tecido ósseo encontrada nos animais WT-Alveolite (Figura 19) e WT-C (Figura 4) já não foi tão discrepante quanto à observada entre as duas linhagens no período anterior (7 dias). Também foi observado nos WT-A maior quantidade de vasos sanguíneos em relação ao tempo de 7 dias e presença marcante de osteoclastos (Figura 19).

Aos 21 dias (Figura 19), houve uma redução do tecido conjuntivo e em algumas regiões já era notável a presença de trabéculas ósseas um pouco mais espessas em relação ao período anterior de 14 dias, mas não tão espessas quanto às observadas nos animais WT-C (21 dias, Figura 4). Aparentemente houve um pequeno atraso no processo de reparo e com menor formação óssea nos animais infectados (WT-Alveolite, Figura 19) quando comparado os camundongos não infectados (WT-Controle, Figura 4). Também foi observada a presença dos vasos sanguíneos, alguns osteoclastos e regiões medulares.

Figura 19. Fotomicrografia dos terços coronal (T2), médio (T4) e apical (T6) dos alvéolos de camundongos WT em condições infecciosas (WT-Alveolite) após exodontia nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias. HE, aumentos de 10x e 40x.

4.4.2 Análise histomorfométrica do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos WT-Alveolite

Na análise histomorfométrica foi quantificada a densidade de volume dos diferentes parâmetros observados na análise histológica. Apesar do aparente atraso na formação óssea evidenciado na análise histológica descritiva, foi observado apenas uma tendência a menor densidade de volume de matriz óssea nos animais infectados (WT-A) em relação ao grupo controle (WT-C, Figura 20), mas que não foi estatisticamente significativa.

As únicas estruturas quantificadas em que foram constatadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) foi relação aos leucócitos e aos osteoclastos. No parâmetro das células inflamatórias observou-se uma tendência à maior densidade de volume em todos os períodos quando comparado o grupo WT-Alveolite com o WT-Controle, que só foi estatisticamente significativa no tempo inicial de 0 hora e no pico do infiltrado inflamatório aos 7 dias ($p < 0,05$, Figura 20), regredindo nos períodos posteriores (14 e 21 dias). A densidade de osteoclastos também foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$, Figura 20) no seu pico aos 14 dias.

As demais estruturas analisadas não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os animais não infectados (WT-Controle) e infectados (WT-Alveolite, Figura 20). Apesar da indução da isquemia previamente à infecção do alvéolo, a densidade de volume de coágulo no grupo infectado (WT-A) foi semelhante à quantificada nos WT-Controle, não havendo diferença estatística entre os grupos (WT-C e WT-A). Nesse parâmetro a cinética entre ambos os grupos também foi similar apresentando seu pico no período inicial de 0 hora, regredindo significativamente no período de 7 dias, e praticamente inexistente nos períodos posteriores de 14 e 21 dias. A cinética do parâmetro “outros” também foi semelhante à apresentada pelo grupo WT-Controle.

O tecido conjuntivo foi quantificado por meio de fibras e fibroblastos, em ambos parâmetros a cinética foi semelhante à dos WT-Controle com pico aos 7 dias regredindo gradativamente nos demais períodos. Já os osteoblastos tiveram seu pico aos 14 dias. A densidade de volume dos vasos, também seguiu uma cinética semelhante à encontrada nos WT-C com um aumento progressivo na quantidade de vasos ao longo dos períodos (7, 14 e 21 dias).

Figura 20. Análise comparativa da densidade de volume de diferentes parâmetros no reparo ósseo alveolar nos períodos experimentais de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós exodontia nos camundongos WT em condições homeostáticas (WT-Controle) e infecciosas (WT-Alveolite). Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. * $p < 0,05$, diferença estatisticamente significativa entre os grupos WT-C e WT-A. ○ Grupo WT-Controle e ● Grupo WT-Alveolite.

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

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

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 WT-A.

4.4.3.1 Análise molecular da expressão de quimiocinas

Nos dois grupos analisados (WT-C e WT-A) a cinética de expressão de CXCL1 teve seu pico aos 7 dias pós-exodontia, sendo significativamente mais expressivo nos WT-Alveolite ($p < 0,05$). A expressão de CCL5 no grupo WT-A apresentou níveis de expressão mais elevados quando comparado ao grupo WT-C, também no período de 7 dias pós-exodontia ($p < 0,05$). Já a quimiocina CCL2 apresentou seu pico de expressão aos 14 dias pós-exodontia em ambos os grupos (WT-C e WT-A) e sem nenhuma diferença significativa entre eles. De uma maneira geral, os animais submetidos à alveolite experimental (WT-A) apresentaram uma tendência à maior expressão de quimiocinas quando comparados ao grupo controle (WT-C) ($p > 0,05$).

Figura 21. Cinética de expressão de quimiocinas envolvidas no reparo ósseo alveolar de camundongos C57Bl/6 WT em condições homeostáticas (WT-C) e infecciosas (alveolite experimental, WT-A). Amostras do tecido alveolar 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. * $p < 0,05$, diferença estatisticamente significativa.

4.4.3.2 Análise molecular da expressão de citocinas

Com base nos resultados obtidos por PCR mostrados anteriormente, foi investigada então a expressão mais detalhada das citocina pró- e anti-inflamatórias (TNF- α e IL10, respectivamente), ao longo dos períodos de reparo de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós exodontia nos camundongos WT-Controle (condições homeostáticas).

Foi constatado que o pico de expressão das citocina pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL6 ocorreu aos 7 dias do processo de reparo ósseo alveolar com aumento significativo em condições infecciosas em relação a homeostática, regredindo gradativamente nos períodos seguintes.

Já a anti-inflamatórias IL-10 que em condições homeostáticas teve seu pico aos 7 dias do processo de reparo ósseo alveolar, em condições infecciosas esse pico ocorre mais tardiamente aos 14 dias, regredindo no período seguinte (21d).

Figura 22. Cinética de expressão da citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e anti-inflamatória (IL-10) no reparo ósseo alveolar de camundongos C57Bl/6 WT em condições homeostáticas (Controle) e infecciosas (Alveolite). Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão 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.

4.4.3.3 Análise molecular da expressão de marcadores do metabolismo ósseo

Analisando a expressão do fator de crescimento BMP2, observou-se uma redução significativa em sua expressão no grupo WT-A quando comparado ao controle (WT-C).

Em relação à análise da expressão dos diferentes marcadores ósseos, também foi observado uma tendência à menor expressão de mRNA de RUNX2 nos animais WT-A, em especial nos períodos de 7 e 14 dias. Já a expressão de COL1a1 apresentou uma redução significativa no grupo alveolite (WT-A) no período de 7 dias em relação ao grupo controle (WT-C).

Na 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 ($p>0,05$). 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 ($p>0,05$), assim como a expressão de DMP1, fosfoproteína ácida da matriz dentinária, crítica para a mineralização adequada do tecido ósseo e dentinário ($p>0,05$). 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 ($p>0,05$), nos diferentes períodos de reparo ósseo alveolar.

Figura 23. Cinética de expressão de marcadores do metabolismo ósseo no tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 WT em condições homeostáticas e infecciosas submetidos à alveolite experimental. Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) 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. * $p < 0,05$, diferença estatisticamente significativa entre os grupos WT-C e WT-A.

4.4.3.4 Análise molecular da expressão de marcadores osteoclastogênicos

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 significativa ($p < 0,05$) de mRNA de RANKL e de catepsina K (CTSK) aos 7 dias nos grupos WT-A em relação ao grupo WT-C. Já a expressão de OPG teve seu pico aos 14 dias, mas não houve diferença estatística na sua expressão quando comparados os grupos WT-A e WT-C

Figura 24. Cinética de expressão de marcadores de osteoclastos no tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 WT em condições homeostáticas e infecciosas e submetidos à alveolite experimental. Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) 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. * $p < 0,05$, diferença estatisticamente significativa entre os grupos WT-C e WT-A.

Figura 25. Fotomicrografia dos terços médios (T4) dos alvéolos de camundongos WT, TNFp55KO e IL10KO em condições não-infecciosas (homeostáticas, Controle) após exodontia nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias. HE, aumentos de 10x e 40x.

Figura 26. Fotomicrografia dos terços médios (T4) dos alvéolos de camundongos WT, TNFp55KO, IL10KO em condições infecciosas (Alveolite) após exodontia nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias. HE, aumentos de 10x e 40x.

4.5 Camundongos WT (WT-Alveolite) e TNFp55KO (TNF- Alveolite) em condições infecciosas (alveolite experimental):

4.5.1 Análise histológica da cinética do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos TNF-Alveolite em relação aos WT-Alveolite

No alvéolo dos camundongos TNF(p55)KO em que foi induzida a alveolite experimental, o reparo ósseo apresentou uma cinética semelhante aos demais grupos WT (Controle e Alveolite) e TNFp55KO-Controle (Figuras 25 e 26). A análise do reparo ósseo alveolar seguiu padrão de cinética semelhante nos terços superficial ou coronal (região T2), médio (região T4) e apical (região T6) do alvéolo.

No período inicial de 0 hora (Figura 26), imediatamente após a exodontia, apesar da indução prévia da isquemia, após a infecção, semelhante ao que ocorreu no grupo WT-Alveolite, o alvéolo mostrou-se completamente preenchido por coágulo sanguíneo, com presença de algumas células inflamatórias, além de alguns espaços vazios deixados possivelmente pelo exsudato inflamatório, semelhante ao encontrado nos camundongos WT (Controle e Alveolite) e TNF-Controle (Figuras 25 e 26).

Aos 7 dias (Figura 26), nos animais TNFp55KO-A ainda persistiu a presença de um remanescente de coágulo e o infiltrado inflamatório mostrou-se mais abundante em relação ao grupo TNF-Controle (Figura 25), mas menos acentuado quando comparado ao grupo WT-Alveolite (Figura 26). Também foi observada a presença do tecido de granulação, com vasos sanguíneos neoformados e tecido conjuntivo caracterizado pelos fibroblastos e matriz extracelular rica em fibras colágenas. Nesse período (7 dias) foi mantida a proporção de menor formação óssea no grupo TNFp55KO-A em relação aos WT-Alveolite (Figura 26). No entanto, em relação aos animais TNF-Controle (Figura 25), o impacto negativo da alveolite foi atenuado nos camundongos TNFp55KO, e aparentemente não houve diferença na proporção de tecido ósseo formado entre os grupos controle e infectado.

Aos 14 dias (Figura 26), nos camundongos TNFp55KO-A foi observado um tecido conjuntivo mais maduro e menos abundante em relação ao período anterior (7 dias) proporcionalmente à substituição por tecido ósseo. Foi constatada maior quantidade de trabéculas ósseas em relação ao tempo de 7 dias e já atingindo até

mesmo a região central do alvéolo. Nesse período (14 dias) a quantidade de osso encontrada nos animais TNFp55KO-A ainda foi menor quando comparada aos animais também infectados WT-A (Figura 26), mas essa diferença já não foi tão discrepante quanto a observada entre as duas linhagens no período anterior (7 dias). Também foi observado a presença osteoclastos e vasos sanguíneos.

Aos 21 dias, houve uma redução do tecido conjuntivo e em algumas regiões já era notável a presença de trabéculas ósseas um pouco mais espessas em relação ao período anterior de 14 dias, mas não tão espessas quanto às observadas nos animais WT-A (21 dias, Figura 26). Nesses períodos mais tardios de 14 e 21 dias, aparentemente não houve muita diferença em relação à proporção de osso encontrada no alvéolo dos camundongos infectados (TNFp55KO-A, Figura 26) quando comparado aos camundongos não infectados (TNFp55KO-C, Figura 25). Ainda no período de 21 dias também foram observados osteoclastos, algumas regiões medulares e a presença marcante de vasos sanguíneos.

4.5.2 Análise histomorfométrica

Na análise histomorfométrica foi quantificada a densidade de volume dos diferentes parâmetros observados na análise histológica. De forma semelhante a que ocorreu nos animais WT do grupo alveolite, apesar isquemia do alvéolo provocada previamente à infecção do mesmo, nas linhagens TNFp55KO, a densidade de volume de coágulo foi semelhante à quantificada nos animais não infectados (TNFp55KO-C), não havendo diferença estatística entre os grupos controle e alveolite. Nesse parâmetro a cinética entre ambos os grupos também foi similar apresentando seu pico no período inicial de 0 hora, regredindo significativamente no período de 7 dias, e praticamente inexistente nos períodos posteriores de 14 e 21 dias.

Mesmo com a indução da alveolite, em todos os períodos (0h, 7d, 14d e 21d) foi observado apenas uma tendência à maior densidade de volume de células inflamatórias no grupo infectado (TNFp55KO-A) em relação ao grupo não infectado (TNFp55KO-C). Quando comparado aos animais WT infectados (WT-A), houve uma tendência à menor quantidade de células inflamatórias na linhagem TNFp55KO-A, mas que só foi de fato estatisticamente significativa no pico do infiltrado inflamatório aos 7 dias ($p < 0,05$, Figura 27).

Também houve uma redução na densidade de osteoclastos aos 14 dias nos camundongos TNFp55KO-A em relação aos WT-A ($p < 0,05$, Figura 27).

Com relação à matriz óssea, manteve-se uma tendência à menor densidade de volume ao longo de todos os períodos (0h, 7d, 14d e 21d) quando comparados os animais infectados TNFp55KO-A e WT-A, no entanto essa diferença não foi estatisticamente significativa. Também não houve diferença estatística entre a proporção de matriz óssea quantificada na linhagem TNFp55KO quando comparado os grupos controle (TNFp55KO-C) e alveolite (TNFp55KO-A).

As demais estruturas analisadas também não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os animais infectados TNFp55KO-A, nem em relação ao controle não infectado TNFp55KO-C e nem aos WT-Alveolite (Figura 27).

Figura 27. Análise comparativa da densidade de volume de diferentes parâmetros no reparo ósseo alveolar nos períodos experimentais de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós exodontia nos camundongos em condições homeostáticas WT-C e TNFp55KO-C, e infecciosas WT-A e TNFp55KO-A. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. $p < 0,05$ entre os grupos Controle e Alveolite da mesma linhagem, sendo * (WT-C vs WT-A) e ** (TNFp55KO-C vs TNFp55KO-A) e entre linhagens diferentes (WT vs TNFp55KO) # para o grupo Controle e ## para o grupo Alveolite. ○ Grupo WT-Controle; ● Grupo WT-Alveolite; □ Grupo TNFp55KO-Controle ■ Grupo TNFp55KO-Alveolite.

4.6 Camundongos WT (WT-Alveolite) e IL10KO (IL10- Alveolite) em condições infecciosas (alveolite experimental):

4.6.1 Análise histológica da cinética do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos IL10-Alveolite em relação aos WT-Alveolite

No alvéolo dos camundongos IL10KO em que foi induzida a alveolite experimental, o reparo ósseo apresentou uma cinética semelhante aos demais grupos WT (Controle e Alveolite) e IL10KO-Controle. A análise do reparo ósseo alveolar seguiu padrão de cinética semelhante nos terços superficial ou coronal (região T2), médio (região T4) e apical (região T6) do alvéolo.

No período inicial de 0 hora (Figura 26), imediatamente após a exodontia, apesar da indução prévia da isquemia, semelhante ao que ocorreu nos demais grupos infectados (alveolite), o alvéolo mostrou-se completamente preenchido por coágulo sanguíneo, com presença de algumas células inflamatórias, além de alguns espaços vazios deixados possivelmente pelo exsudato inflamatório, semelhante ao encontrado nos camundongos WT (Controle e Alveolite) e IL10KO-Controle (Figuras 25 e 26).

Aos 7 dias, nos animais IL10KO-A ainda persistiu a presença de um remanescente de coágulo bem proeminente em relação ao WT-A (Figura 26) e o IL10-C (Figura 25). O infiltrado inflamatório mostrou-se mais abundante em relação ao grupo IL10-Controle (Figura 25), mas um pouco menos acentuado quando comparado ao grupo WT-Alveolite (Figura 26). Também foi observada a presença do tecido de granulação, com vasos sanguíneos neoformados e tecido conjuntivo caracterizado pelos fibroblastos e matriz extracelular rica em fibras colágenas. Nesse período (7 dias) a proporção de osso formada no IL10KO-A aparentemente foi menor em relação à mesma linhagem não-infectada (IL10-C, Figura 25) e bem acentuada quando comparado os animais IL10KO-A com os WT infectados (WT-A, Figura 26).

Por limitações na obtenção de mais animais *knockouts* para IL10, não foi possível a realização do grupo IL10KO-Alveolite no período de 14 dias.

Aos 21 dias manteve-se uma aparente redução na proporção de osso formado nos animais IL10KO-A em relação à mesma linhagem não-infectada (IL10-C, Figura 25). Essa diferença foi ainda mais acentuada quando comparado os

animais IL10KO-A com os WT infectados (WT-A, Figura 26). Apesar do aumento na quantidade de trabéculas em relação ao período anterior (7 dias), elas não obtiveram uma espessura considerável. No período de 21 dias ainda foram observados a presença de osteoclastos, algumas regiões medulares, vasos sanguíneos, além de tecido conjuntivo que em alguns animais mostrou-se alterado (Figura 26).

4.6.2 Análise histomorfométrica

Na análise histomorfométrica foi quantificada a densidade de volume dos diferentes parâmetros observados na análise histológica. E como já mencionado anteriormente, na linhagem IL10KO do grupo alveolite não obtivemos o período de 14 dias. De forma semelhante a que ocorreu nas demais linhagens do grupo alveolite, apesar isquemia do alvéolo provocada previamente à infecção do mesmo, nas linhagens IL10KO, a densidade de volume de coágulo foi semelhante à quantificada nos animais não infectados (IL10KO-C), não havendo diferença estatística entre os grupos controle e alveolite. Nesse parâmetro a cinética entre ambos os grupos também foi similar, apresentando seu pico no tempo inicial de 0 hora. A presença do remanescente de coágulo aos 7 dias teve sua densidade de volume estatisticamente maior nos animais infectados quando comparado aos não infectados da mesma linhagem (IL10KO-C) e aos WT do grupo alveolite ($p < 0,05$, Figura 28); e praticamente inexistente aos 21 dias.

No parâmetro das células inflamatórias observou-se uma tendência à maior densidade de volume em todos os períodos quando comparado aos camundongos não infectados da mesma linhagem (IL10KO-C) apresentando uma diferença estatisticamente significativa no pico do infiltrado inflamatório aos 7 dias ($p < 0,05$, Figura 28) e regredindo no período de 21 dias. No entanto, aos 7 dias também houve uma tendência ao aumento na contagem de leucócitos nos alvéolo dos animais WT-Alveolite em relação aos IL10KO-Alveolite, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. No parâmetro “outros”, correspondente aos espaços vazios deixados pelo exsudato inflamatório e nos períodos mais tardios às regiões medulares, a cinética foi semelhante à apresentada nos demais camundongos.

Com relação à densidade de volume de matriz óssea, a cinética de formação óssea foi semelhante à dos demais grupos atingindo seu pico aos 21 dias, mas com

menor densidade de volume nos IL10KO-A quando comparados aos WT-A nos períodos de 7d e 21d ($p < 0,05$, Figura 17). Também foi observada uma tendência à menor quantidade de matriz óssea nos camundongos IL10KO do grupo alveolite (IL10KO-A) em relação ao controle (IL10KO-C), mas cuja diferença não foi estatisticamente significativa.

A densidade de volume de osteoblastos na linhagem IL0-A foi menor em relação aos WT-A ($p < 0,05$, Figura 17). Semelhante ao observado em relação à matriz óssea, os camundongos IL10KO do grupo alveolite (IL10KO-A) também apresentaram uma tendência à menor quantidade de osteoblastos quando comparado ao controle (IL10KO-C). Já em relação à quantificação dos osteoclastos, uma vez que as diferenças mais significativas em todos os grupos ocorriam aos 14 dias, essa comparação em relação aos IL10KO-A ficou prejudicada devido à ausência desse período no grupo alveolite.

Figura 28. Análise comparativa da densidade de volume de diferentes parâmetros no reparo ósseo alveolar nos períodos experimentais de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós exodontia nos camundongos em condições homeostáticas WT-C e IL10KO-C, e infecciosas WT-A e IL10KO-A. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. $p < 0,05$ entre os grupos Controle e Alveolite da mesma linhagem, sendo * (WT-C vs WT-A) e ** (IL10KO-C vs IL10KO-A) e entre linhagens diferentes (WT vs IL10KO) # para o grupo Controle e ## para o grupo Alveolite. ○ Grupo WT-Controle; ● Grupo WT-Alveolite; △ Grupo IL10KO-Controle; ▲ Grupo IL10KO-Alveolite.

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

A dinâmica do reparo ósseo e sua interação com o sistema imune têm sido estudadas no ramo da osteoimunologia. No entanto, apesar de já ser considerado extremamente importante esse balanço entre a resposta inflamatória e a formação óssea, tal interação permanece pouco compreendida (Takayanagi 2007; Lorenzo, Horowitz et al. 2008; Takayanagi 2013). Os modelos anteriormente utilizados não possibilitavam (por motivos técnicos, tais como o tamanho das peças e lesões, ou ainda pelas características da patogênese de cada condição experimental) o estudo adequado do reparo ósseo. Assim, ainda não estão completamente estabelecidas as possíveis influências da interação entre o sistema ósseo e imunológico na formação óssea subsequente à reabsorção (*coupled bone formation*) e no processo de reparo ósseo, bem como os mecanismos moleculares determinantes em tais processos.

A maior parte dos trabalhos realizados analisou o reparo ósseo em modelos de fratura. Entretanto, apesar de algumas similaridades, o conhecimento do processo de consolidação da fratura não pode ser integralmente extrapolado no contexto geral de reparo ósseo devido às suas particularidades. O processo de reparo de ossos longos fraturados varia conforme o tipo da fratura e a presença ou não de imobilização, mas em sua maior parte ocorre o processo de ossificação endocondral, com a formação inicial de um tecido cartilaginoso que posteriormente é substituído por tecido ósseo (Devlin, Hoyland et al. 1997; Kanyama, Kuboki et al. 2003; Giannoudis, Einhorn et al. 2007; Marsell and Einhorn 2011; Mills and Simpson 2012).

Nesse contexto, o processo de reparo ósseo alveolar representa um excelente modelo de estudo tanto dos tecidos moles quanto duros (Kanyama, Kuboki et al. 2003; Korpi, Astrom et al. 2009). O reparo ósseo pós-exodontia vem sendo descrito ao longo de anos em estudos clínicos em humanos e experimentais em diferentes espécies como macacos (Scala, Lang et al. 2013), cães (Cardaropoli, Araujo et al. 2003; Discepoli, Vignoletti et al. 2013), coelhos (Lalani, Wong et al. 2003; Lalani, Wong et al. 2004; Lalani, Wong et al. 2005), ratos (Devlin, Hoyland et al. 1997; Kanyama, Kuboki et al. 2003; Accorsi-Mendonca, Paiva et al. 2008) e inclusive alguns trabalhos em camundongos (Grewe and Felts 1969; Tomomatsu, Aoki et al. 2009). Embora já esteja bem consolidado que o reparo ósseo alveolar é um

processo complexo, sequencial e bem regulado, envolvendo diferentes tipos de células e tecidos (Korpi, Astrom et al. 2009; Lin, Rios et al. 2011), ainda faltavam estudos buscando compreender os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo.

Utilizamos a técnica adaptada em nosso laboratório (Figura 1) para a obtenção de exodontia em camundongos, que apresenta um reparo semelhante ao descrito em outras espécies, mas com a vantagem de permitir diversas abordagens experimentais mais específicas. Neste estudo foram utilizados apenas camundongos machos para evitar influência das variações hormonais (Mills and Simpson 2012; Oertelt-Prigione 2012; Oertelt-Prigione 2012). Os camundongos são animais experimentais com utilização bastante difundida na imunologia devido ao seu fácil manejo e por terem seus processos inflamatórios e imunológicos já extensamente estudados e bem conhecidos. Por terem um “*background*” genético conhecido e manipulável, isso propicia a geração de animais geneticamente modificados para a expressão ou ausência de determinados fatores, o que permite o estabelecimento de relações diretas de causa e efeito entre tais fatores e os eventos biológicos/patológicos verificados (Genco, Van Dyke et al. 1998; Bird and Parlee 2000; Holden 2011). Com esse recurso, é possível esclarecer mecanismos envolvidos na regulação do tecido ósseo durante o reparo alveolar em condições homeostáticas fornecendo fundamentos básicos para a compreensão desses mecanismos também nos processos patológicos (Korpi, Astrom et al. 2009; Tomomatsu, Aoki et al. 2009). É importante destacar que diante de todas as vantagens da utilização de camundongos geneticamente modificados como modelo experimental, eles representam uma situação extrema (Mak, Penninger et al. 2001). Em nosso estudo, utilizamos animais *knockouts* em que a ausência de determinada citocina ou mais especificamente do seu receptor, foi uma ferramenta interessante para a elucidação de papéis individuais de tais mediadores.

O termo “condições homeostáticas”, designado para os grupos controles deste estudo, refere-se na verdade a uma condição não infecciosa com a ausência de inoculação de microrganismos. Pois, na verdade, a própria exodontia já provoca uma perturbação da homeostasia tecidual. Atualmente, já se sabe que mesmo na ausência de bactérias, qualquer tipo de dano tais como uma condição de estresse ou morte celular, ou a própria lesão tecidual provocada por um trauma cirúrgico, podem desencadear a liberação de moléculas endógenas. Essas moléculas foram

previamente conhecidas como “padrões de perigo” ou “alarminas” e no contexto atual são agrupadas sob a terminologia de “padrões moleculares associados a danos”, com a sigla original do inglês DAMPs. Inicialmente, a chamada “inflamação asséptica” foi descrita com suporte na hipótese de que o sistema imune tem a função de combater o perigo e não simplesmente reconhecer o não-próprio frente ao próprio (Matzinger 1994), e vem ganhando crescente atenção (Piccinini and Midwood 2010). Assim, mesmo em condições não infecciosas (“homeostáticas”), a liberação de DAMPs ativa mecanismos imunes e inflamatórios (Lotze, Zeh et al. 2007). Em nosso modelo de estudo, o estímulo para o início do processo inflamatório é baseado no trauma cirúrgico decorrente da remoção do dente, que gera lesão tecidual, rompimento de vasos sanguíneos e possivelmente da liberação desses DAMPs.

Para a caracterização e padronização deste modelo de reparo em camundongos inicialmente foi realizado um estudo piloto com os períodos de 0 hora, 1, 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias pós-exodontia. O critério de seleção dos períodos foi feito com base na questão ética de utilizar o menor número de animais necessários para o estudo efetivo (Bird and Parlee 2000; Holden 2011) e no fato de que a obtenção desses animais, em especial dos *Knockouts*, depende da disponibilidade de seu fornecimento, que pode variar em função da biologia de cada linhagem (Mak, Penninger et al. 2001). Como o intuito deste trabalho foi evidenciar o papel das citocinas (TNF α e IL10) na formação e reparo ósseo, optamos por delimitar o estudo nos períodos em que havia uma formação óssea mais significativa. Dessa forma, desconsideramos os períodos de 1 e 3 dias pós-exodontia em que ainda havia presença de grande quantidade de coágulo (dados não mostrados). Limitamos este estudo até o período de 21 dias, uma vez este seria o pico de maior formação óssea, já que nos períodos posteriores (28, 35 e 42 dias, dados não mostrados) há um declínio na quantidade óssea, devido ao processo de remodelação óssea com maior formação de tecido medular. Mesmo assim, não foi possível obter quantidade de animais *knockouts* suficientes para completar o grupo IL10KO alveolite. Diante dessa limitação, preferimos optar por completar o número de amostras com o processo de reparo no período mais inicial (7 dias) e final (21 dias), do que o período intermediário de 14 dias.

Devido à configuração anatômica do dente com uma curvatura acentuada (Figura 1), eventualmente ocorre fratura de alguns dentes, sendo esses animais

desconsiderados. Foram considerados apenas os camundongos em que após a exodontia ao conferir o elemento dental ao estereomicroscópio sua extremidade apical estivesse completa. No entanto, uma das limitações deste modelo é que por se tratar de roedores, seus incisivos apresentam crescimento contínuo (Grewe and Felts 1969). Assim, a permanência do germe dental no alvéolo, em geral, acarreta em nova formação dentária, o que fica mais evidenciado nos períodos mais avançados. As lâminas com presença de dentes foram desprezadas e não quantificadas. Coincidentemente, as poucas amostras separadas para a microtomografia apresentaram a presença do germe dental nos períodos de 7, 14 e 21 dias. Os demais camundongos foram direcionados diretamente para o processamento histológico sem a obtenção prévia das microtomografias, e só foi observada a completa ausência de remanescente dental após a obtenção dos cortes histológicos da região apical.

A obtenção das imagens tridimensionais (3D) pela técnica de microtomografia computadorizada (Micro-CT) permitiram uma visualização complementar, de cada período experimental (0h, 7d, 14d e 21d, Figura 3) dos camundongos WT-Controle como um recurso adicional para evidenciar melhor as áreas que seriam posteriormente analisadas por cortes histológicos. Dessa forma foi possível a observação da maxila de diferentes ângulos. Na região da extração foi evidenciado a presença de material hiperdenso compatível à formação de trabéculas da matriz óssea iniciado a partir dos 7 dias de reparo e com aumento progressivo até os 21 dias, preenchendo praticamente todo o alvéolo e que foi confirmado posteriormente com mais detalhe nos cortes histológicos (Figura 4).

A maior parte dos estudos com reparo de alvéolos utilizam cortes longitudinais (Cardaropoli, Araujo et al. 2003; Discepoli, Vignoletti et al. 2013; Scala, Lang et al. 2013). Inicialmente realizamos testes pilotos em camundongos WT com a obtenção de cortes longitudinais que abrangessem toda a extensão do alvéolo em um único corte (Figura 3). No entanto, a angulação da maxila dificulta a obtenção de cortes que atinjam precisamente o longo eixo do alvéolo e conseqüentemente a totalidade de sua extensão. Estudo de reparo alveolar em ratos comparando os dois tipos de cortes transversal e longitudinal, relatou a dificuldade na obtenção dos cortes longitudinais paralelos ao longo eixo do alvéolo dos incisivos. Uma vez que nos cortes longitudinais são preservadas apenas as paredes ósseas vestibular e lingual, sendo desprezadas as paredes ósseas lateral e medial, não se pode assegurar

precisamente a análise da porção central do alvéolo por falta de mais estruturas como referência (Okamoto and Vasconcelos Fialho 1990). Além disso, com base no relato desses autores e em nossa experiência, durante a adaptação do bloco no micrótomo, na tentativa de acertar os cortes, pode ocorrer um pequeno desvio no sentido longitudinal, acarretando a perda de quase a metade do alvéolo. No nosso estudo em particular, outro agravante desta técnica seria o tamanho das maxilas, uma vez que os camundongos tem um tamanho bem menor quando comparado aos demais modelos, o que também limita a quantidade de cortes obtidos. Perdido o longo eixo do alvéolo essa amostra era desconsiderada, o que limitaria ainda mais o número de animais a serem analisados em especial nos grupos *Knockouts* (KO). Diante disso, o emprego de cortes transversais do alvéolo, supera boa parte dos empecilhos abordados anteriormente em relação aos cortes longitudinais. Em contrapartida, a análise utilizando cortes transversais necessita de maior quantidade de cortes histológicos, mas em compensação possibilita um estudo morfológico mais detalhado de toda extensão alveolar, em especial da área de maior interesse que seria a porção central do alvéolo (Okamoto and Vasconcelos Fialho 1990).

Alguns eventos da sequência do reparo ósseo alveolar estão bem descritos, principalmente do ponto de vista histológico. Imediatamente após a exodontia o alvéolo é completamente preenchido por coágulo sanguíneo, com a presença das plaquetas carregadas de diversos fatores de crescimentos, além de células inflamatórias. Semelhante ao que ocorre no processo de reparo de fratura (Dimitriou, Tsiridis et al. 2005; Tsiridis, Upadhyay et al. 2007; Marsell and Einhorn 2011), basicamente, a extração do dente inicia cascatas envolvendo formação de coágulo sanguíneo, que resulta na liberação de fatores de crescimento como PDGF, IGF, TGF- β , FGF e VEGF. Rapidamente inicia-se a formação de uma rede de fibrina (Cardaropoli, Araujo et al. 2003; Lalani, Wong et al. 2003; Lalani, Wong et al. 2005; Korpi, Astrom et al. 2009; Lin, Rios et al. 2011; Rodrigues, Cardoso et al. 2011; Discepoli, Vignoletti et al. 2013).

Em seguida, ocorre gradualmente a invasão de fibroblastos que tem origem principalmente da diferenciação de células mesenquimais e mitose de fibroblastos preexistentes nos remanescentes do ligamento periodontal aderidos à parede alveolar. A participação dos remanescentes do ligamento periodontal já foi questionada por alguns autores, mas confirmada em outros trabalhos (Devlin, Hoyland et al. 1997; Lin, Rios et al. 2011). Esta particularidade e o fato de ser um

defeito com todas as paredes limitantes torna esse ambiente de reparo mais favorecido quando comparado aos demais. As células inflamatórias recrutadas produzem várias citocinas que orquestram o processo de reparo, mas cujos papéis até então não haviam sido bem descritos.

Simultaneamente, ocorre proeminente processo angiogênico com a proliferação de capilares sanguíneos que tem origem a partir de células endoteliais e juntamente com o aparecimento transitório de focos de infiltrado inflamatório, caracterizam a formação de um tecido de granulação com a presença de grande número de fibroblastos e fibras. Os novos vasos sanguíneos podem ser identificados no tecido de granulação e incorporados ao tecido ósseo neoformado. Subsequentemente, uma redução de eventos inflamatórios é acompanhada por uma substituição gradual de tecido de granulação por tecido conjuntivo (Korpi, Astrom et al. 2009; Lin, Rios et al. 2011; Rodrigues, Cardoso et al. 2011). Esta fase caracteriza-se por uma atividade intensa de fibroblastos de síntese de matriz extracelular, e à medida que ocorre o aumento de fibras colágenas, diminui a população celular e os vasos sanguíneos caracterizando a fase de maturação do tecido conjuntivo (Cardaropoli, Araujo et al. 2003; Rodrigues, Cardoso et al. 2011).

Paralelamente à regressão do tecido conjuntivo, ocorre sua substituição por tecido ósseo recém-formado pelo processo osteogênico, com a diferenciação e ativação de osteoblastos, produzindo diferentes proteínas colagenosas e não colagenosas que conduzem à formação de matriz orgânica, e enzimas, tais como fosfatase alcalina, responsáveis pela mineralização, resultando na formação de osso. À medida que ocorre a formação óssea, inicia-se também o processo de remodelação do tecido neoformado (Korpi, Astrom et al. 2009; Lin, Rios et al. 2011; Rodrigues, Cardoso et al. 2011). O processo de reparo alveolar é considerado completo quando o alvéolo dental estiver totalmente preenchido por trabéculas ósseas espessas com canais medulares bem definidos, além da crista óssea remodelada (Carano and Filvaroff 2003; Kanczler and Oreffo 2008; Schipani, Maes et al. 2009). No entanto, os mecanismos moleculares concomitantes aos eventos celulares e teciduais que levam ao reparo ósseo alveolar não são completamente compreendidos.

A análise molecular permitiu detectar a expressão de determinados genes que participam regulando o processo de reparo, e correlacioná-los com os parâmetros avaliados na análise histológica e histomorfométrica, como coágulo, infiltrado

inflamatório, tecido conjuntivo propriamente dito e tecido ósseo. Dessa forma, foram selecionados como alvos moleculares alguns fatores de crescimento, marcadores ósseos e de matriz extracelular, citocinas e quimiocinas potencialmente envolvidos no metabolismo ósseo e no reparo de forma geral.

Entre as moléculas envolvidas no processo de reparo, encontra-se a superfamília do TGF- β (fator de crescimento transformador-beta) que desempenha um papel-chave na homeostasia óssea (Ehnert, Baur et al. 2010) e é composta por fatores de crescimento e diferenciação, incluindo as BMPs (proteínas ósseas morfogenéticas); o próprio TGF- β ; dentre outros (Dimitriou, Tsiridis et al. 2005; Tsiridis, Upadhyay et al. 2007).

Dos membros da família das BMPs, neste estudo, analisamos a expressão das BMPs -2 a -7, e verificamos uma maior expressão de BMP-2, BMP-4, e BMP-7. A BMP-2 atua no recrutamento de células mesenquimais, podendo iniciar a cascata de cicatrização e regular a expressão de outras BMPs (Dimitriou, Tsiridis et al. 2005; Tsiridis, Upadhyay et al. 2007). Na ausência de BMP-2, células progenitoras mesenquimais não se diferenciam no local de reparo, levando a uma falha no processo de reparo. Assim, a BMP2 atuaria também após a fase de recrutamento das células osteoprogenitoras, direcionando as células-tronco da medula óssea à diferenciação osteoblástica final, por atuar diretamente na expressão de RUNX2 e Osterix. Estes dados identificam a BMP-2 como um componente necessário na capacidade de regeneração inerente ao tecido ósseo e fornecem uma perspectiva molecular para o início do reparo esquelético endógeno (Tsuji, Bandyopadhyay et al. 2006; Bais, Wigner et al. 2009). Juntamente com a BMP-2, a BMP-6 também tem um papel importante na indução da diferenciação da linhagem específica de células tronco mesenquimais em osteoblastos (Dimitriou, Tsiridis et al. 2005; Tsiridis, Upadhyay et al. 2007), apesar da expressão de BMP-6 ter sido menor e com um pico mais tardio em relação à BMP-2. Já a BMP-4 foi altamente expressa em nossos resultados. Em estudo com osteoblasto de ratos a BMP-4 aumentou a atividade de fosfatase alcalina. A BMP-4 também se liga ao colágeno do tipo I, além de um possível papel na angiogênese durante o desenvolvimento ósseo ao se ligar com o colágeno do tipo IV e a heparina (Reddi and Cunningham 1993). Dessa forma, a BMP-2 e -4 apresentam funções distintas na osteoblastogênese, sendo essenciais nesse processo (Bandyopadhyay, Tsuji et al. 2006). Outra BMP bastante expressa em nosso estudo foi a BMP-7, que teria um papel na expansão de células

progenitoras e na diferenciação dos osteoblastos, mas diferindo da BMP-2 por não interferir na expressão de RUNX2, apenas na do gene Osterix (Bais, Wigner et al. 2009).

Em nosso estudo, a BMP-3, também conhecida como osteogenina, teve uma pequena expressão. Estudos relatam que a BMP-3 é um antagonista das BMPs osteogênicas e tem um papel na regulação da osteogênese. Em estudo *in vitro* já foi demonstrado que a BMP-3 foi capaz de antagonizar os efeitos da BMP-2 em induzir o comprometimento osteogênico e a diferenciação; além de regular negativamente a densidade do osso *in vivo* (Dimitriou, Tsiridis et al. 2005; Tsiridis, Upadhyay et al. 2007). E por fim, a BMP-5 não foi significativa (dados não mostrados) em nosso modelo de reparo ósseo alveolar, e ao que parece esta molécula estaria mais envolvida no reparo de fraturas, com um papel regulatório em ambos os tipos de ossificação (Dimitriou, Tsiridis et al. 2005; Tsiridis, Upadhyay et al. 2007).

De forma geral, o TGF- β 1 é uma proteína multifuncional que inicia a sinalização de uma ampla variedade de respostas em vários tipos de células diferentes, estando envolvido na embriogênese, diferenciação, cicatrização de feridas, produção de matriz extracelular (MEC) e adesão célula-célula. O TGF- β 1 regula ainda muitas funções osteoblásticas incluindo a expressão de genes de MEC, como por exemplo de colágeno e fibronectina, e os correspondentes receptores de integrina (Ehnert, Baur et al. 2010). Em nosso estudo, a expressão de TGF- β 1 foi bastante significativa com pico aos 7 dias do reparo pós-exodontia, período de intensa produção de tecido conjuntivo e início da formação óssea com maior pico de quantidade de osteoblastos. Posteriormente, aos 14 dias a expressão do TGF- β 1 ainda foi bastante significativa, regredindo no período seguinte de 21 dias, o que também coincidiu com a diminuição da quantidade de tecido conjuntivo e de osteoblastos.

Sem nenhuma dúvida a angiogênese é essencial para o reparo ósseo (Kanyama, Kuboki et al. 2003; Hankenson, Dishowitz et al. 2011) e de maneira geral o que caracteriza um processo de reparo é a formação do tecido de granulação. Nesse processo já foi demonstrado que as BMPs também estimulam a angiogênese por meio da expressão de VEGF-A por osteoblastos (Dimitriou, Tsiridis et al. 2005; Tsiridis, Upadhyay et al. 2007) e que pelo menos uma parte da atividade osteogênica do TGF- β 1 seria atribuído à produção de VEGF-A (Dai and Rabie 2007). O VEGF, geralmente referido como VEGF-A, é um dos mais importantes

fatores pró-angiogênicos já identificados por ser um potente estimulador da proliferação de células endoteliais, e, portanto um mediador fundamental da angiogênese fisiológica e fisiopatológica (Neufeld, Cohen et al. 1999; Dai and Rabie 2007). Em nosso estudo, este fator foi altamente expresso com pico aos 7 dias coincidindo com o início da formação do tecido de granulação. Outro fator importante na neogênese e consequentemente na formação do tecido de granulação é o FGF. Tanto o FGF-1 e FGF-2, promovem o crescimento e diferenciação de uma variedade de células, incluindo células epiteliais, miócitos, osteoblastos e condrócitos. FGF-2 é expresso por osteoblastos e é geralmente mais potente que o FGF-1 (Lieberman, Daluiski et al. 2002). Em nossos resultados, a expressão de FGF-2 foi significativa em 7 dias, tendo seu pico aos 14 dias, o que coincidiu com a presença do tecido de granulação e a quantidade de osteoblastos, que também regrediram juntamente com a expressão do FGF-2 no período de 21 dias.

Dentre os marcadores de matriz, analisamos a expressão de enzimas modificadoras da matriz extracelular, como as metaloproteinases (MMPs). As MMPs pertencem a uma família de enzimas proteolíticas dependentes do cálcio e zinco, as quais têm a função de degradação e remodelação de proteínas da matriz extracelular e superfície celular durante diferentes processos fisiológicos, incluindo desenvolvimento embriológico, cicatrização, reação de corpo estranho, inflamação, angiogênese, remodelação óssea, processo de reparo, bem como os patológicos como periodontite, artrite reumatoide, câncer, osteoporose, arterosclerose (Birkedal-Hansen, Moore et al. 1993; Ryan, Ramamurthy et al. 1996; Lafleur, Handsley et al. 2003; Visse and Nagase 2003). Essas proteases são expressas por células inflamatórias como polimorfonucleares, monócitos/macrófagos, linfócitos, além de células residentes como fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais, osteoblastos, osteócitos (Birkedal-Hansen, Moore et al. 1993; Hatori, Sasano et al. 2004) e podem refletir o grau de anabolismo e catabolismo do colágeno, durante os processos inflamatório e de reparo (Haerian, Adonogianaki et al. 1995).

Normalmente, os transcritos de MMP são expressos em níveis baixos, mas estes níveis aumentam rapidamente quando os tecidos sofrem remodelação, tais como cicatrização de feridas e remodelação óssea (Zambuzzi, Paiva et al. 2009). No processo de reparo as MMPs têm um papel fundamental na degradação do colágeno, na migração de células inflamatórias e na angiogênese (Vu and Werb

2000; Page-McCaw, Ewald et al. 2007; Accorsi-Mendonca, Paiva et al. 2008; Korpi, Astrom et al. 2009; Repeke, Trombone et al. 2009).

De todas as MMPs analisadas no presente estudo, a mais expressiva foi a MMP-1. Tanto a MMP-1 quanto a MMP-8 são denominadas collagenases por degradarem fibras colágenas. A cinética de ambas collagenases (MMP-1 e MMP-8, Figura 8) foi semelhante com pico aos 7 dias, coincidindo com a presença do tecido de granulação, com intensa formação e remodelação do colágeno, além do início da formação óssea, regredindo sua expressão aos 14 dias. Já a MMP-2, conhecida como gelatinase, devido à sua alta atividade no colágeno já desnaturado, teve uma expressão significativa aos 7 dias, mas só atingiu seu pico aos 14 dias (Figura 8). Atualmente, sabe-se que além das MMPs classificadas como collagenase, estudos *in vitro* demonstraram que a MMP-2, classificada anteriormente como gelatinase, também pode atuar como uma collagenase (Krane, Byrne et al. 1996).

A ativação de MMPs é regulada por um grupo de proteínas endógenas chamado de inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs), sendo cada um deles capaz de inibir quase todos os membros da família MMP de uma forma não específica (Baker, Edwards et al. 2002). Normalmente, as TIMPs estão em equilíbrio com as MMPs e a matriz é remodelada de forma altamente controlada, mantendo a homeostase dos tecidos. A cinética das TIMPs 1 e 3 analisadas em nosso estudo (Figura 8) foi semelhante à das collagenases, atingindo seu pico de expressão aos 7 dias, confirmando seu papel regulador sobre as MMPs.

Ainda com relação aos marcadores de matriz, analisamos também o colágeno do tipo I (COL-I), mais especificamente a expressão de Col1a1 e Col1a2 (Figura 8). Sendo o primeiro (Col1a1) responsável por codificar as duas cadeias de pró-colágeno $\alpha 1$ e o segundo (Col1a2) codifica uma cadeia de pró-colágeno $\alpha 2$, que juntas formam a estrutura de tripla hélice da molécula do colágeno tipo I. A expressão de Col1a1 e Col1a2 foram mais significativa nos períodos de 7 e 14 dias, coincidindo com a maior quantidade de fibras e o início da formação óssea. A expressão do COL-1 pode ser considerada tanto um marcador de matriz do tecido conjuntivo propriamente dito, por ser seu principal componente; quanto um marcador ósseo, sendo fundamental na constituição da matriz óssea orgânica e responsável por grande parte de suas propriedades físicas.

Na análise molecular também foi observada a expressão de colágeno do tipo II (Figuras 6 e 8). Esse tipo de colágeno é característico do tecido cartilaginoso, e o

reparo ósseo alveolar não é precedido pela formação de cartilagem. No entanto, já foi demonstrado que os osteoblastos dos alvéolos podem expressar o RNAm do pró-colágeno e do colágeno do tipo II, embora se estiver presente, o colágeno do tipo II seria responsável por menos de 0,01% das proteínas totais extraídas (Devlin, Hoyland et al. 1997).

Dentre os diferentes marcadores ósseos, analisamos a expressão de RUNX2 (Cbfa1) um dos principais marcadores de osteoblastos, bem como de moléculas produzidas por tal tipo celular durante diferentes etapas da formação da matriz orgânica do tecido ósseo (como COL-I e OCN) e de sua mineralização (como ALP, Figura 9). O Runx2 é um fator de transcrição essencial que regula a diferenciação dos osteoblastos e consequentemente a osteogênese, sendo, portanto, fundamental no processo de reparo ósseo. Em nossos resultados a expressão de Runx2 foi significativa aos 7 dias, atingindo seu pico aos 14 dias, o que coincidiu com os períodos com maior quantidade de osteoblastos. Aos 21 dias houve uma regressão na expressão de Runx2, mas ainda significativa, o que é justificado uma vez que o Runx2 também contribui para a remodelação óssea, por meio da regulação de OPG e RANKL (Liu, Lengner et al. 2011 192).

A fosfatase alcalina (ALP) é considerada um marcador de atividade osteoblástica precoce, por ser uma enzima responsável pela mineralização do tecido ósseo em formação. A análise da ALP mostrou-se significativa a partir dos 7 dias do reparo, mantendo sua expressão aos 14 dias e com pico aos 21 dias. Já a expressão de osteocalcina (OCN), marcador dos estágios mais avançados da diferenciação celular dos osteoblastos e atividade osteoblástica tardia, teve uma expressão mais significativa a partir dos 14 dias, atingindo seu pico também aos 21 dias. Neste estudo, também foram analisados marcadores da transformação fenotípica de osteoblastos em osteócitos como o DMP1 e PHEX. O DMP1, fosfoproteína ácida da matriz dentinária, tem papel crítico na mineralização adequada da matriz óssea e dentinária. Outra proteína envolvida na mineralização da matriz óssea é a proteína codificada pelo gene PHEX (Endopeptidase Neutra Reguladora de Fosfato). Ambas tiveram uma expressão significativa aos 14 dias, com pico aos 21 dias (Figura 9).

Em nossa análise molecular por PCR Array ainda foi constatada uma expressão significativa do *Sost* (Figura 6). Esse gene (*Sost*) codifica a esclerostina (*sclerostin*) proteína secretada principalmente por osteócitos, considerada um

marcador do osteócito maduro e um regulador negativo da diferenciação e função de osteoblastos, o que consequentemente leva à inibição da formação óssea (Winkler, Sutherland et al. 2003; Winkler, Yu et al. 2004; Poole, van Bezooijen et al. 2005; Dimitriou, Tsiridis et al. 2006; Bonewald 2011; Ominsky, Li et al. 2011). A esclerostina pode atuar como um antagonista da BMP, competindo com BMP-2, -4, -6, -7 na ligação por seus receptores. Desse modo, a esclerostina diminui a atividade dos osteoblastos e proliferação de células mesenquimais, modulando a sobrevivência dos osteoblastos e reduzindo a diferenciação das células osteoprogenitoras. Além disso, a esclerostina proporciona um novo nível de regulação da formação de osso, promovendo apoptose de células ósseas, que desempenham um papel crítico durante o desenvolvimento e maturação do esqueleto, bem como na remodelação óssea e processos de reparo na vida adulta. Por outro lado, a esclerostina também pode aumentar a atividade de BMP por ligação e inativação da atividade antagonista de *noggin* (Winkler, Sutherland et al. 2003; Winkler, Yu et al. 2004; Dimitriou, Tsiridis et al. 2006).

Recentemente, foi sugerido que a amelobastina (Ambn), uma proteína da matriz do esmalte produzida por ameloblastos, poderia estar envolvida na formação óssea intramembranosa e endocondral (Spahr, Lyngstadaas et al. 2006; Tamburstuen, Reppe et al. 2010; Iizuka, Kudo et al. 2011; Tamburstuen, Reseland et al. 2011), e promovendo o reparo ósseo (Bosshardt 2008; Haze, Taylor et al. 2009). No entanto, em nosso estudo a expressão dessa proteína não foi significativa (Figuras 6 e 9), o que está de acordo com recente estudo que demonstrou que a AMBN não teve influência na atividade osteogênica *in vitro*, nem participou da remodelação óssea craniofacial sob estresse mecânico e nem no reparo de defeitos ósseos de tamanhos não críticos (Kuroda, Wazen et al. 2011).

Com relação a agentes osteoclastogênicos como o RANKL, ligante responsável pela diferenciação e ativação de osteoclastos, este teve uma expressão significativa aos 7 dias, que se manteve elevada aos 14 dias. A catepsina K, protease altamente expressa em osteoclastos, que desempenha um papel essencial na reabsorção óssea atuando como uma potente enzima que degrada a matriz extracelular, também teve seu pico de expressão aos 14 dias o que coincidiu com a maior quantificação de osteoclastos. Já a molécula OPG, um receptor solúvel “decoy” de RANKL, teve sua expressão mais elevada a partir dos 14 dias, mantendo-se ainda elevada aos 21 dias. Este fato é fundamental para que haja um

controle no processo de reabsorção óssea por meio do equilíbrio harmônico do sistema RANK/RANKL/OPG (Teitelbaum 2000; Alliston and Derynck 2002; Theill, Boyle et al. 2002; Takayanagi 2013), como já explicado anteriormente.

Citocinas, polipeptídeos secretados por células da imunidade natural e adquirida em resposta a microrganismos e outros antígenos, medeiam e regulam reações imunológicas e inflamatórias (Abbas, Lichtman et al. 2012). 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. Com relação à expressão das citocinas, a análise das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e anti-inflamatória (IL-10) nos camundongos WT (WT-C), demonstraram um pico de expressão aos 7 dias do processo de reparo ósseo alveolar em condições homeostáticas, regredindo gradativamente nos períodos seguintes (14d e 21d, Figura 12). Como observado previamente pela análise de PCR *Array* (Figura 6) e confirmada posteriormente com esses resultados (Figura 12), de todas as citocinas analisadas as mais expressivas foram TNF- α e IL-10. Sabe-se que na fase inicial do reparo alveolar, a expressão de TNF- α é significativa, em decorrência do estímulo da exodontia (Rodrigues 2007; Cardoso 2009; Cardoso, Ferreira Junior et al. 2011). A alta expressão de IL10 modularia esse processo inflamatório transitório.

Nossos resultados demonstram que o padrão de expressão de quimiocinas e de migração celular obedece a uma cinética similar. As quimiocinas, membros de uma vasta família de pequenas proteínas solúveis, sendo consideradas pequenas citocinas quimiotáticas que estimulam o recrutamento de células inflamatórias (Aggarwal, Ghobrial et al. 2006; Silva, Garlet et al. 2007) e que apresentam capacidade de controle de adesão, quimiotaxia e ativação leucocitária (Guerreiro, Santos-Costa et al. 2011). Tendo em vista sua potencial importância no processo de reparo ósseo alveolar, analisamos a expressão de quimiocinas e observamos que o recrutamento de células inflamatórias está diretamente associado à maior expressão de quimiocinas. No presente estudo não foi feita nenhuma distinção dos tipos de células inflamatórias na contagem. De forma geral, pela análise molecular podemos constatar que aos 7 dias houve pico de expressão de CXCL1 (KC ou MIP-2 α) e CXCR1 associada a migração de neutrófilos; CCL1 associado à migração de monócitos e de outras quimionas como CCL3 (ou MIP-1 α) e CCL5 (ou RANTES) envolvidas no recrutamento de diferentes tipos de leucócitos, além da expressão de

CCR4, CCR5 e CXCR3. Ao passo que CCR1, CCL2 (ou MCP-1) e seu receptor CCR2, também responsáveis pela quimioatração de diferentes leucócitos tiveram seu pico aos 14 dias, bem como a expressão de CCL17 no recrutamento de células T e de CX3CL1 no recrutamento de células T, NK e macrófagos.

Após a caracterização morfológica e molecular do processo de reparo ósseo alveolar nos camundongos WT em condições homeostáticas (controle, Figuras 4 a 11) e diante do entendimento que diferentes classes de citocinas (pró- e anti-inflamatórias, Figura 12) exercem papéis fundamentais na modulação direta dos fatores envolvidos no processo de reparo ósseo, buscamos então compreender de forma mais aprofundada o papel dessas citocinas no reparo ósseo alveolar. Com esse intuito, utilizamos camundongos geneticamente modificados (*Knockouts* - KO) com a ausência de determinada citocina a fim de elucidar o seu papel comparando os resultados obtidos com os dos animais sem nenhuma modificação (WT). Para analisar o papel do TNF- α utilizamos camundongos geneticamente deficientes do receptor p55 (TNF-R1) do TNF- α (TNFp55KO), por ser este o receptor responsável por maior parte dos efeitos pró-inflamatórios do TNF- α . E posteriormente para analisar o papel da IL-10 utilizamos camundongos geneticamente deficientes do gene da citocina IL-10 (IL-10KO).

TNF- α é uma citocina pró-inflamatória amplamente estudada nos processos inflamatórios, no entanto seu papel no reparo do tecido ósseo permanece pouco elucidado. Entre as principais citocinas inflamatórias, TNF- α tem sido relatado como “*upstream*” de outras citocinas, desempenhando um papel central no processo inflamatório (Nanes 2003; Tomomatsu, Aoki et al. 2009). Considerando o perfil inflamatório do TNF- α (Stashenko, Dewhirst et al. 1987; Ridderstad, Abedi-Valugerdi et al. 1991; Dinarello 2000; Henderson and Nair 2003; Garlet, Cardoso et al. 2007; Rauner, Sipos et al. 2007), seria de se esperar uma atenuação do processo inflamatório nos camundongos p55KO em relação aos camundongos WT em condições homeostáticas. Entretanto, em um contexto geral, verificamos que a perda da função do TNF- α decorrente da ausência do receptor p55 não resultou em alterações dramáticas na cinética do reparo alveolar pós-exodontia.

Em condições não infecciosas (homeostáticas, grupo controle), nossos resultados demonstraram que os animais geneticamente deficientes para o receptor p55 de TNF- α apresentaram uma tendência a aumento na quantidade de células inflamatórias no alvéolo dentário após exodontia em relação aos WT, apesar de não

ser estatisticamente significante (Figura 14). Cabe ressaltar que diferente dos modelos associados aos estímulos bacterianos, como já mencionado anteriormente, no presente modelo, o início do processo inflamatório nos grupos controles (homeostáticos) foi desencadeado pelo próprio trauma cirúrgico decorrente da remoção do dente e na ausência de estímulos antigênicos provenientes das toxinas e componentes bacterianos como o LPS.

Outra possibilidade que deve ser considerada, é que esse aparente aumento das células inflamatórias nos camundongos TNFp55KO seja uma consequência da redução da apoptose em virtude da ausência de sinalização pelo TNF- α . De fato, outros estudos relatam aumento da apoptose em consequência do aumento da expressão de TNF- α (Nanes 2003; Liu, Bal et al. 2006; Behl, Siqueira et al. 2008). Estudo em que foi induzido uveíte, por meio da inoculação de LPS de *Salmonella typhimurium* resultou em aumento na expressão de TNF- α levando ao aumento na migração de células inflamatórias e concomitantemente foi observado aumento nos níveis de apoptose (Koizumi, Poulaki et al. 2003). O trauma cirúrgico em nosso modelo de estudo pode ter atuado como o fator inicial desencadeando a migração destas células, possivelmente por meio de outros mediadores quimiotáticos tais como a IL-1 β (Gauldie, Jordana et al. 1993; Ozdemir, Brown et al. 1997). A ausência de TNF- α não estimulou o processo de apoptose, mantendo as células inflamatórias por mais tempo no alvéolo dentário.

Uma vez que o receptor p55 (p55TNF-R1) é responsável pela maioria dos efeitos antimicrobianos e inflamatórios do TNF- α , investigamos por meio de análises moleculares, a expressão de quimiocinas e seus receptores, considerados os principais mediadores do processo de migração celular e o quanto teriam sido afetados nos camundongos TNFp55KO. Nossos dados demonstraram que apesar da tendência ao aumento na contagem de células inflamatórias, nos achados moleculares houve uma ligeira diminuição nos níveis de expressão de quimioatrativos de neutrófilos como CXCL1 (KC) e CXCL3; e de diferentes leucócitos como o CCL3 (MIP1 α) e CCL5 (RANTES), bem como uma menor expressão significativa de CCL-2 (MCP-1) nos animais TNFp55KO em relação aos WT (Figura 15).

A falta de estímulo para o processo de apoptose também deve ter sido determinante para a persistência de grande quantidade de fibroblastos por mais

tempo no alvéolo nos períodos tardios de 14 e 21 dias em relação aos WT (Figura 14).

Um dos resultados mais significantes do presente estudo foi a constatação de uma redução na deposição de tecido ósseo dos camundongos TNFp55KO quando comparados aos WT. Ao mesmo tempo houve uma maior quantidade de fibras colágenas, bem como uma transição tardia do tecido de granulação para o tecido ósseo (Figura 14). Esses dados foram confirmados com os dados moleculares em que houve uma redução estatisticamente significativa na expressão de COL-I (colágeno tipo I, Figura 15), o componente mais abundante no tecido conjuntivo e na matriz óssea orgânica.

De fato o TNF- α apresenta efeitos marcantes sobre as células ósseas. TNF- α estimula várias vias de sinalização em osteoblastos, tais como a p38 MAPK, (Zhou, Foster et al. 2006) JNK (Mukai, Otsuka et al. 2007), NF-kB (Eliseev, Schwarz et al. 2006) e Smurf1 (Guo, Yamashita et al. 2008). Além disso, o TNF- α também regula a expressão de Runx2 de várias maneiras, incluindo a desestabilização de RNAm e supressão da transcrição (Gilbert, He et al. 2002). Em nossos resultados nos camundongos TNFp55KO houve uma diminuição significativa na expressão de RUNX2 (CBFA-1, Figura 15), o que foi compatível com a tendência à menor quantidade de osteoblastos em relação aos WT e, conseqüentemente, à menor formação óssea. Outro estudo também utilizando um modelo de reparo em camundongos TNFp55KO demonstrou apenas uma tendência à redução na contagem do número de osteoblastos por superfície óssea aos 7 dias em relação aos WT (Tomomatsu, Aoki et al. 2009).

Em nosso estudo, também foi constatada uma menor expressão dos marcadores de atividade osteoblásticas precoce (ALP) e tardio (OCN), bem como do marcador de osteócito (PHEX). Assim, o TNF- α pode inibir o processo de osteogênese *in vivo*. Entretanto, uma vez que na ausência do TNFp55 (KO), todos os marcadores osteogênicos foram menos expressos em relação aos WT, pode-se sugerir que um nível fisiológico de TNF- α seria então requisito necessário para o recrutamento inicial de osteoblastos e para estimular a formação óssea. Esse atraso no reparo ósseo em camundongos TNFp55KO também foi demonstrado por outros autores, inclusive no modelo de fratura (Gerstenfeld, Cho et al. 2001; Gerstenfeld, Cho et al. 2003; Tomomatsu, Aoki et al. 2009).

Além de sua atuação sobre os osteoblastos, muitos trabalhos relatam a atuação do TNF- α sobre os osteoclastos, aumentando a reabsorção óssea. Deste modo, a perda óssea inflamatória seria resultado da ação de TNF- α sobre osteoblastos e osteoclastos (Gilbert, He et al. 2000; Gilbert, He et al. 2002; Katagiri and Takahashi 2002; Behl, Siqueira et al. 2008; Herman, Kronke et al. 2008; Lee, Kim et al. 2008; Lacey, Simmons et al. 2009). 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 (Katagiri and Takahashi 2002; Behl, Siqueira et al. 2008; Herman, Kronke et al. 2008; Lee, Kim et al. 2008; Lorenzo, Horowitz et al. 2008).

Nos camundongos TNFp55KO houve uma tendência à menor densidade de volume de osteoclastos em relação aos WT no período de 21 dias, no entanto essa diferença não foi estatisticamente significativa. Estudos prévios relataram que a osteoclastogênese é reduzida nesta linhagem de animais (Andrade, Silva et al. 2007; Ozaki, Ukai et al. 2009; Ochi, Hara et al. 2010). Nos achados moleculares foi quantificado RANKL, uma citocina chave na reabsorção óssea, que mostrou uma tendência a menor expressão nos TNFp55KO em relação aos WT, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa, bem como a expressão de OPG e Catepsina K cuja a expressão não foi alterada nos TNFp55KO sendo semelhante à encontrada nos WT (Figura 15).

Outra citocina analisada no presente estudo e com papel fundamental na modulação do processo de reparo foi a IL10, uma potente citocina pleiotrópica, isto é, que pode atuar em diversos tipos de células e exercer múltiplos efeitos biológicos (Volk, Asadullah et al. 2001; Claudino, Garlet et al. 2010; Abbas, Lichtman et al. 2012). Sua ação anti-inflamatória inibe tanto uma resposta imunoproliferativa quanto uma resposta inflamatória óssea (Evans and Fox 2007; Mohamed, Sugiyama et al. 2007; Menezes, Garlet et al. 2008). Diante disso, analisamos o papel da IL-10 utilizando camundongos geneticamente deficientes do gene da citocina IL-10 (IL-10KO) a fim de desvendar os mecanismos pelos quais a IL-10, modula a homeostase óssea alveolar.

Nossos resultados demonstraram aumento na densidade de volume de células inflamatórias nos camundongos IL10KO em relação aos WT em condições homeostáticas após a exodontia, com um pico significativo no período inicial de 7

dias (Figura 17). Estudos realizados nesta linhagem de animais demonstram que a resposta imune e inflamatória é mais acentuada quando comparada ao grupo controle (Cohen, Moore et al. 2004) possivelmente como resultado da perda de regulação da resposta pela IL-10. Já foi demonstrado que IL-10 bloqueia a translocação nuclear da subunidade p65 de NF- κ B, mas a translocação nuclear da subunidade p50 permanece intacta. Estudo com macrófagos de camundongos demonstraram que a IL-10 inibe principalmente a expressão pós-transcricional de TNF- α (Volk, Asadullah et al. 2001).

Os achados moleculares confirmaram as evidências histológicas, uma vez que o aumento da densidade de células inflamatórias nos IL10KO foi associado a maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α , decorrente da ausência de IL-10 nestes animais. Também foi constatado o aumento na expressão de quimiocinas como CXCL1 (KC), CCL-2 (MCP-1), CCL3 (MIP1 α) e CCL5 (RANTES) nos períodos iniciais em relação aos animais WT (Figura 18). Como já mencionado em relação às linhagens anteriores, no presente modelo o estímulo para o início do processo inflamatório foi em decorrência do trauma cirúrgico pela remoção do dente. Dessa forma, o processo inflamatório é transitório, diferente dos modelos associados aos estímulos inflamatórios crônicos, como a doença periodontal, na qual o papel da IL-10 no controle do metabolismo ósseo surge como um processo imunoregulatório ao estímulo bacteriano e inflamatório crônico.

Apesar do infiltrado inflamatório ter duração transitória, a IL-10 tem demonstrado importante papel no reparo ósseo alveolar, destacando sua ação não só em respostas crônicas, evidenciando sua marcante influência sobre o tecido ósseo. Nossos resultados demonstraram que na ausência de IL-10 em condições homeostáticas (IL10KO-Controle) houve uma redução significativa na deposição óssea no reparo do alvéolo dentário em relação aos animais WT. Isso foi demonstrado tanto nas evidências histológicas (Figura 16), quanto na quantificação da densidade de volume de matriz óssea (Figura 17) e confirmado posteriormente nos achados moleculares (Figura 18). Estudos prévios também demonstraram que camundongos IL-10KO apresentam alterações no tecido ósseo como osteopenia associada a fragilidade mecânica dos ossos longos (Lin, Moniz et al. 1996; Dresner-Pollak, Gelb et al. 2004; Lin, Rios et al. 2011). Em um desses trabalhos os autores relatam que a osteopenia observada nestes animais foi em decorrência da redução

na deposição óssea caracterizada por avaliações morfométrica, associada à redução nos níveis séricos de osteocalcina (Dresner-Pollak, Gelb et al. 2004).

Estudos demonstraram também que camundongos IL10KO mostraram-se altamente susceptíveis à perda de osso alveolar espontânea, mesmo sem indução de doença periodontal ou colocação de ligaduras (Al-Rasheed, Scheerens et al. 2003; Alayan, Ivanovski et al. 2007). De forma mais específica, foi demonstrado que essa perda óssea alveolar espontânea está associada à diminuição na expressão de marcadores de osteoblastos e de formação óssea como fosfatase alcalina e osteocalcina, bem como marcadores de osteócitos como PHEX; de forma independente da ação microbiana, inflamatória ou de reabsorção óssea (Claudino, Garlet et al. 2010).

Em nosso estudo o atraso significativo no reparo ósseo, evidenciado por uma menor densidade da matriz óssea foi confirmado nos achados moleculares. Nossos resultados moleculares também demonstraram que mesmo em condições homeostáticas, nos animais IL10KO houve uma redução significativa na expressão dos marcadores ósseos como BMP2, COL1A1, RUNX2 (CBFA-1), ALP, OCN, DMP1 e PHEX quando comparados aos animais WT-C, ao longo do reparo ósseo pós-exodontia (Figura 18). Assim, além da redução da deposição óssea, os dados obtidos em nossos experimentos revelam redução da densidade de volume de osteoblastos nos camundongos IL-10KO. Assim, ao mesmo tempo em que a presença de IL-10 parece favorecer a osteoblastogênese (Kang, Yang et al. 2007), a ausência desta citocina em camundongos IL-10KO foi refletida em redução da osteoblastogênese (Dresner-Pollak, Gelb et al. 2004).

Associados à redução na densidade de volume dos osteoblastos, nossos resultados mostraram um aumento na densidade de volume de osteoclastos, associados a uma tendência no aumento da expressão de RANKL, CTSK e uma redução nos níveis de OPG que regula a ligação RANK-RANKL. Estudos prévios demonstraram que a falta da IL-10 exerce efeitos diretos sobre a homeostasia do tecido ósseo, sendo um potente inibidor da formação de osteoclastos (Owens, Gallagher et al. 1996; Carmody, Schwarz et al. 2002; Evans and Fox 2007). Sendo assim, a IL-10 tem sido descrita como um regulador negativo da osteoclastogênese (Shin, Lee et al. 2006; Evans and Fox 2007). O efeito inibitório desta citocina ocorre nos períodos iniciais da osteoclastogênese, uma vez que a IL-10 atua diretamente sobre os precursores mononucleares, alterando as vias de sinalização intracelular,

inibindo a expressão e a translocação de NFATc1 e, conseqüentemente, inibindo a diferenciação dos osteoclastos (Evans and Fox 2007; Mohamed, Sugiyama et al. 2007). Contudo, outros autores não encontraram diferenças entre o número de osteoclastos presentes na superfície óssea entre os grupos de camundongos WT e IL-10KO (Dresner-Pollak, Gelb et al. 2004).

Proporcionalmente, à menor formação óssea, os animais IL10KO apresentaram maior presença de fibras colágenas, demonstrando um atraso significativo na substituição do conjuntivo por tecido ósseo, quando comparados aos animais WT-controle.

Os resultados até aqui discutidos demonstraram a importância do processo inflamatório e o papel da modulação das citocinas pró- e anti-inflamatórias (TNF- α e IL10), bem como seus mecanismos moleculares no reparo ósseo alveolar em condições não infecciosas (homeostáticas, controle). No entanto, algumas desordens locais e/ou sistêmicas podem perturbar e até mesmo atrasar o processo de reparo ósseo alveolar. Dentre esses problemas está a alveolite, uma complicação que ainda tem uma grande incidência pós-exodontia (Blum 2002; Rodrigues 2007; Cardoso 2009; Cardoso, Rodrigues et al. 2010; Cardoso, Ferreira Junior et al. 2011; Rodrigues, Cardoso et al. 2011; Dodson 2013). Na literatura, o primeiro relato de alveolite consta desde 1896 (BLUM 2002, apud Crawford 1896) e por ser uma patologia odontológica ainda persistente e com discordância de tratamentos, ainda há estudos recentes buscando um consenso para a forma mais precisa e segura de sua prevenção e tratamento (Rodrigues 2007; Cardoso 2009; Cardoso, Rodrigues et al. 2010; Cardoso, Ferreira Junior et al. 2011; Rodrigues, Cardoso et al. 2011; Dodson 2013).

Em nosso estudo, a utilização do modelo de infecção experimental dos alvéolos, mimetizando um quadro de alveolite experimental, teve como foco principal não o estudo da alveolite propriamente dita. Com o modelo proposto buscamos estabelecer uma condição inflamatória e infecciosa, que caracteristicamente resultasse em exacerbada resposta imune e inflamatória local e ampliar o foco de investigação dessa condição no processo de reparo ósseo alveolar (Blum 2002; Torres-Lagares, Serrera-Figallo et al. 2005; Noroozi and Philbert 2009). Assim, buscamos o entendimento dos mecanismos de ação e a cinética de expressão de diferentes citocinas e moléculas do metabolismo ósseo envolvidos no reparo ósseo mediante um processo inflamatório e infeccioso. Esse conhecimento mais

aprofundado pode posteriormente ser extrapolado para outras patologias que atingem o tecido ósseo, como osteomielite, abscesso periapical.

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. Também nesses modelos, a análise histomorfométrica 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. 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 2007; Cardoso 2009; Cardoso, Ferreira Junior et al. 2011; Rodrigues, Cardoso et al. 2011).

Apesar de em nosso estudo não ter sido obtida uma alveolite tão característica quanto ao modelo em ratos, ainda sim foram encontradas algumas diferenças pontuais quando comparadas à resposta do reparo em condições não infecciosas. Após a formação inicial do coágulo (zero hora), nos camundongos WT infectados (WT-alveolite) houve um aumento considerável na densidade de volume de células inflamatórias (Figura 20) o que foi confirmado pelos dados moleculares (Figuras 21 a 24). Como já mencionado anteriormente, mesmo em condições homeostáticas (não infecciosas), na fase inicial do reparo alveolar há um aumento significativo de TNF- α em decorrência ao estímulo da exodontia (Figura 12). Mas estudo em ratos com modelo de alveolite demonstrou que essa expressão é ainda maior nos alvéolos infectados (Rodrigues 2007; Cardoso 2009; Cardoso, Ferreira Junior et al. 2011). De fato, nossos resultados demostraram que nos animais submetidos à alveolite experimental, sobretudo na fase inicial do processo de reparo, aos 7 dias, houve um pico de resposta imune do tipo Th1, caracterizada pela presença de citocinas pro-

inflamatórias e do tipo Th1: TNF- α , IL-1 β cuja expressão foi mais significativa do que em relação aos animais em condições homeostáticas (Figura 22). Já a expressão de mediadores Th2, no que diz respeito à citocina anti-inflamatória IL-10, mostrou picos diferentes entre os animais do grupo controle e infectados. Enquanto o reparo em condições homeostáticas apresentou um equilíbrio na modulação entre as citocinas pró- e anti-inflamatória, em condições infecciosas o pico da citocina anti-inflamatória (IL-10) foi mais tardio, ocorrendo somente aos 14 dias (Figura 22).

Além das citocinas, quimiocinas envolvidas no processo inflamatório podem influenciar diretamente o reparo ósseo em condições infecciosas. Isso foi confirmado em nossos achados moleculares (Figura 21) em que aos 7 dias houve um aumento significativo na expressão de CXCL1 (KC ou MIP-2 α) associada a migração de neutrófilos; e CCL5 (ou RANTES) envolvidas no recrutamento de diferentes tipos de leucócitos. Também houve uma tendência ao aumento da expressão de CCL2 (ou MCP-1) também responsáveis pela quimioatração de diferentes leucócitos com pico aos 14 dias acompanhando a mesma cinética dos animais não infectados (WT-controle).

A inoculação de bactérias gera uma resposta imune e inflamatória mais acentuada. A expressão de TNF- α nos animais WT é consideravelmente baixa, se comparada àquela vista em camundongos WT infectados com *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. E a expressão de TNF- α em tecidos periodontais submetidos às forças ortodônticas, também resultam em uma resposta diferencial do tecido ósseo (Andrade, Silva et al. 2007). Sendo assim, é possível sugerir que o papel do TNF- α como citocina pró-inflamatória seja mais evidente em circunstâncias onde a resposta imune e inflamatória é exacerbada, seja pela presença de microrganismos específicos ou pela aplicação de forças que resultam em resposta tecidual.

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 (Garlet, Avila-Campos et al. 2005; Garlet, Cardoso et al. 2007; Nowzari, Botero et al. 2008; de Oliveira, Schwartz-Filho et al. 2009). 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 and Jiang 1995; Jiang, Magli et al. 1999; Graves and Cochran 2003; Nowzari, Botero et al. 2008). 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 (Stashenko, Dewhirst et al. 1987; Ridderstad, Abedi-Valugerdi et al. 1991; Dinarello 2000; Gilbert, He et al. 2000; Gilbert, He et al. 2002; Henderson and Nair 2003; Garlet, Cardoso et al. 2007; Rauner, Sipos et al. 2007).

Além do acentuado infiltrado leucocitário, evidências histológicas mostraram proeminente tecido de granulação e um pequeno atraso no reparo ósseo quando comparado os animais WT controle e alveolite (Figuras 4 e 19, respectivamente). Algumas evidências foram confirmadas nos dados moleculares (Figura 23). A expressão do fator de crescimento BMP2 aumentou gradativamente, mas enquanto no grupo controle atingiu seu pico de expressão no período de 7 dias pós-exodontia, nos animais infectados WT-A essa expressão foi menor e com pico mais tardio ocorrendo somente aos 14 dias e ainda não tão expressivo quanto nos WT-C. Subsequentemente, ao aparecimento do infiltrado inflamatório, houve a formação do tecido de granulação com neoformação vascular e tecido conjuntivo, gradativamente substituído por tecido ósseo com um pequeno atraso. Em relação aos marcadores de matriz extracelular e tecido ósseo foi constatada redução significativa apenas na expressão de COL1a1 aos 7 dias nos animais WT-A em relação aos WT-C. Quanto aos demais marcadores ósseo no grupo WT-A foi observada apenas uma tendência à menor expressão de RUNX2 nos períodos de 7 e 14 dias, ALP no período de 7 dias e de PHEX nos períodos de 14 e 21 dias e a mesma cinética de expressão de OCN e DMP1 quando comparado ao grupo WT-C (Figura 23). Essa redução na expressão de alguns marcadores de formação óssea como RUNX2 e OCN, também foi identificada no reparo ósseo de camundongos WT em que previamente à exodontia foi injetado LPS via subcutânea na região da calvária (Tomomatsu, Aoki et al. 2009).

Nos animais infectados (WT-Alveolite), houve um aumento significativo na densidade de volume dos osteoclastos (Figura 20) quando comparado aos não infectados (WT-Controle). O que também foi confirmado nos resultados moleculares em que houve um aumento significativa expressão de RANKL em relação ao grupo controle. Já os níveis de RNAm de OPG, falso (“decoy”) receptor de RANKL, permaneceu inalterado (Figura 24). Assim, a razão RANKL/OPG foi aumentada com a indução da alveolite nos camundongos WT, indicando supra-regulação (“*upregulation*”) da atividade de reabsorção óssea, que também foi confirmada com o aumento nos níveis de expressão da enzima catepsina K (Ctsk) que também indica a atividade dos osteoclastos. Resultados semelhantes foram obtidos no estudo com camundongos em que foi injetado LPS nos animais WT, porém diferentemente do nosso estudo, a metodologia utilizada por esse autor não favoreceu a quantificação dos osteoclastos que não foi mostrada (Tomomatsu, Aoki et al. 2009).

Mesmo não sendo tão agressiva quanto o observado em ratos, o nosso modelo de infecção dos alvéolos (alveolite experimental) também foi testado nos animais *knockouts* (KO) de ambas linhagens TNFp55KO e IL10KO, esta última será discutida posteriormente.

Nos camundongos TNFp55KO do grupo alveolite (TNFp55KO-A) houve uma tendência ao aumento no infiltrado inflamatório em relação aos TNFp55KO-Controle. No entanto, quando comparado aos animais WT infectados (WT-A), houve uma redução na densidade de volume de células inflamatórias nos TNFp55KO-Alveolite (Figura 27). Esse dado foi confirmado com a diminuição na expressão de CCL2 e CX3CL1. Esse importante papel pró-inflamatório do TNF- α , atenuado nas linhagens de camundongos TNFp55KO devido à ausência do receptor p55 também foi demonstrado em um modelo de infecção dos tecidos periodontais induzido por *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, em que mesmo após a inoculação do periodontopatógeno nos animais TNFp55KO foi observado uma redução na severidade da doença periodontal em relação aos WT (Garlet, Cardoso et al. 2007).

Outros modelos experimentais também demonstraram essa atenuação do processo inflamatório relacionadas à ausência do papel funcional do TNF- α . Estudo em camundongos demonstrou que a redução na expressão de TNF- α resultava em uma menor agressividade da encefalomielite experimental induzida por meio da inoculação de *Mycobacterium tuberculosis* (Ito, Bebo et al. 2001). A indução de

peritonite em camundongos por meio de inoculação de bactérias resulta em anormalidades morfológicas na mucosa intestinal, sendo estas alterações positivamente correlacionadas com os níveis de expressão de TNF- α . Terapias com bloqueadores de TNF- α e do receptor TNFp55 previnem as alterações teciduais, confirmando o papel pró-inflamatório desta citocina (Song, Lv et al. 2009).

O impacto negativo da alveolite foi atenuado nos camundongos TNFp55KO, caracterizado por evidências histológicas de um reparo adequado e redução no número de osteoclastos quando comparado aos WT-A. Estudos com modelo de doença periodontal induzido por *Actinobacillus actinomycetemcomitans* mostrou uma redução nos níveis de expressão de RANKL nos camundongos TNFp55KO infectados em relação aos WT (Garlet, Cardoso et al. 2007).

No grupo TNFp55KO-Alveolite, a matriz óssea quantificada demonstrou uma tendência à redução, mantendo uma proporção menor em relação aos animais WT também infectados. No entanto, quando comparado dentro da mesma linhagem os grupos controle (TNFp55KO-C) e alveolite (TNFp55KO-A), aparentemente os efeitos da alveolite foram atenuados nesses animais que não apresentaram diferença na densidade de volume de matriz óssea. No estudo, já mencionado anteriormente em que foi injetado LPS via subcutânea na região da calvária previamente à exodontia na linhagem TNFKO e comparado o reparo do alvéolo com o dos animais WT também infectados. Diferente dos resultados obtidos nos WT em que a presença do LPS aumentou os níveis séricos de TNF- α e diminuiu a densidade mineral óssea e a taxa de aposição mineral, essa diferença não foi observada nos TNFp55KO. Esses autores concluíram que a inibição da osteogênese por inflamação induzida por LPS é TNF- α dependente e que a ativação do NF-kB é um processo fundamental nessa inibição (Tomomatsu, Aoki et al. 2009).

Já nos animais infectados (IL10KO-Alveolite) houve um aumento no infiltrado inflamatório em relação aos IL10KO-Controle, que foi confirmado pela densidade de leucócitos aumentada (Figura 28) e níveis mais elevados de mediadores pró-inflamatórios (IL-1 β , TNF- α , CXCL1, CCL2 e CCL3). No entanto, com base nos dados da literatura era de se esperar um aumento ainda maior no processo inflamatório em relação aos animais WT infectados (WT-A), o que não ocorreu. Uma das justificativas para este resultado seriam as dificuldades já relatadas anteriormente em relação ao momento de introduzir as bactérias no alvéolo que

pode ter comprometido a isquemia do mesmo, dificultando a padronização da alveolite obtida entre as linhagens WT e IL10KO.

Por outro lado, mesmo o infiltrado inflamatório sendo menor nos IL10KO-Alveolite em relação aos WT-Alveolite, com relação à formação óssea foi observado um atraso no reparo no grupo IL10KO infectado (IL10KO-Alveolite). Essa evidência foi confirmada pela menor densidade de matriz óssea e diminuição na expressão de CBFA-1, ALP, OCN e PHEX.

Estudos com camundongos deficientes para IL10 demonstraram aumento nos índices de severidade de doenças ósseas inflamatórias, como doença periodontal e artrite reumatóide (Bartold, Marshall et al. 2005; Claudino, Trombone et al. 2008; Kobayashi, Kono et al. 2011). Nossos resultados também demonstraram um aumento no número de osteoclastos nos camundongos IL10KO infectados (IL10-Alveolite) em relação aos WT infectados (WT-Alveolite). De fato, estudos mostram que camundongos IL-10KO apresentam maior susceptibilidade a reabsorção óssea alveolar após indução de doença periodontal com *Porphyromonas gingivalis* (Sasaki, Okamatsu et al. 2004).

Realmente, IL-10 parece inibir a osteoclastogênese, principalmente nos estágios iniciais da diferenciação do pré-osteoclasto em osteoclasto (Evans and Fox 2007; Mohamed, Sugiyama et al. 2007). Além do mais, a presença de IL-10 induz a produção de uma proteína chamada SOCs que inibe a sinalização intracelular de citocinas responsáveis pela ativação do fator de transcrição NFkB, fator responsável por diversos papéis de caráter inflamatório, dentre eles a osteoclastogênese (Menezes, Garlet et al. 2008).

Enfim, no nosso modelo experimental de indução de alveolite, apesar de ter sido utilizado a mesma metodologia aplicada em estudos anteriores em ratos (Rodrigues 2007; Cardoso 2009; Cardoso, Ferreira Junior et al. 2011; Rodrigues, Cardoso et al. 2011), a presença da alveolite experimental não demonstrou alterações clínicas e nem alterou, de maneira significativa, a cinética do reparo ósseo alveolar. Nos camundongos mesmo com o aumento das células inflamatórias e uma tendência à redução do tecido ósseo, a alveolite não foi de fato muito agressiva, desencadeando apenas efeitos pontuais e discretos durante o reparo ósseo alveolar.

Uma das hipóteses que poderia justificar 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, Kaffe et al. 1993; Witte and Barbul 1997; Korpi, Astrom et al. 2009). 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 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 citocinas, no presente modelo, para alterar, de maneira significativa, a cinética do processo de reparo ósseo alveolar.

Em todos os camundongos infectados (alveolite) das diferentes linhagens (WT-A, TNFp55-A, IL10-A), mesmo com a hemostasia e a utilização de adrenalina promovendo a isquemia do alvéolo, ainda houve elevada densidade de volume de coágulo sanguíneo no período inicial (0 hora) do reparo. Como em todo modelo experimental, acreditamos que este resultado possa ter sido em virtude de uma limitação da metodologia. Uma vez promovida a isquemia efetiva do alvéolo, a posterior penetração do cone de papel absorvente embebido com a solução contendo as bactérias, estimulava novamente a formação de um novo sangramento. Provavelmente, a formação desse novo coágulo pode ter “diluído” a presença das bactérias e favorecido o processo de reparo, o que explicaria também o fato da alveolite não ter sido tão agressiva quanto esperado.

Diante dessa limitação da metodologia, levantamos algumas alternativas que poderiam ter sido utilizadas na tentativa de obter uma alveolite experimental mais intensa. Uma solução seria a inoculação das bactérias juntamente com a adrenalina a fim de evitar a estimulação de um novo coágulo que pudesse prejudicar a ação das bactérias. Ou ainda aumentar o tempo de permanência da adrenalina e das bactérias também poderia intensificar o efeito das mesmas.

A importância do conhecimento do processo de reparo ósseo alveolar e sua ampla caracterização podem contribuir não apenas para o conhecimento da fisiopatologia do reparo ósseo, mas proporcionar ferramentas para investigações

específicas. Esses conhecimentos específicos podem servir de base para o desenvolvimento de novas estratégias para intervenções clínicas no processo de formação e reparo ósseos, além de possibilitar a prevenção e o tratamento de patologias ósseas. A modulação do processo imune/inflamatório pode ser alvo de intervenções clínicas diretas com drogas já existentes e liberadas para uso humano. Grandes avanços têm sido direcionados para o desenvolvimento de inibidores específicos de citocinas, assim como de citocinas recombinantes, que tem sido aplicadas em diversos ensaios clínicos e algumas já liberadas para uso humano.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia aplicada e os resultados obtidos, concluímos que:

- O reparo ósseo alveolar em camundongos apresenta uma cinética de eventos histológicos semelhante aos descritos em modelos em humanos e experimentais em outras espécies; sendo tal modelo adequado para o estudo do processo de reparo ósseo alveolar.
- Do ponto de vista molecular, o reparo ósseo alveolar envolve a expressão de diversos fatores de crescimento, de matriz extracelular, marcadores osteogênicos e osteoclastogênicos, bem como a modulação de quimiocinas e citocinas, sugerindo um possível papel para tais fatores no processo de reparo ósseo.
- A ausência de IL-10 está associada a maior atividade inflamatória e reabsorção óssea, concomitante com menor formação óssea. Enquanto que, a deficiência de TNF- α afeta o recrutamento de leucócitos e a cinética de reparo ósseo alveolar. Dessa forma, é possível concluir que ambas citocinas interferem no reparo ósseo alveolar por meio de mecanismos que controlam migração de leucócitos, modulação de quimiocinas e expressão de marcadores osteogênicos, tanto em condições homeostáticas quanto infecciosas.
- A alveolite experimental resultou no aumento da expressão de citocinas e quimiocinas inflamatórias, além de maior quantidade de leucócitos e osteoclastos, porém, de forma geral, a cinética do reparo não foi retardada pela alveolite. O impacto negativo da alveolite foi atenuado nos camundongos TNFp55KO, caracterizado por um reparo adequado com diminuição no número de leucócitos e osteoclastos em relação aos animais WT-Alveolite. Já nos camundongos IL10KO a presença da alveolite intensificou a redução na densidade da matriz óssea em relação ao seu respectivo controle.

Referências

REFERÊNCIAS

- Abbas, A., A. Lichtman, et al. (2012). *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro, Elsevier.
- Accorsi-Mendonca, T., K. B. Paiva, et al. (2008). "Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and RECK during alveolar bone regeneration in rat." *J Mol Histol* **39**(2): 201-208.
- Aggarwal, R., I. M. Ghobrial, et al. (2006). "Chemokines in multiple myeloma." *Exp Hematol* **34**(10): 1289-1295.
- Ai-Aql, Z. S., A. S. Alagl, et al. (2008). "Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis." *J Dent Res* **87**(2): 107-118.
- Al-Rasheed, A., H. Scheerens, et al. (2003). "Accelerated alveolar bone loss in mice lacking interleukin-10." *J Dent Res* **82**(8): 632-635.
- Al-Rasheed, A., H. Scheerens, et al. (2004). "Accelerated alveolar bone loss in mice lacking interleukin-10: late onset." *J Periodontal Res* **39**(3): 194-198.
- Alayan, J., S. Ivanovski, et al. (2007). "Alveolar bone loss in T helper 1/T helper 2 cytokine-deficient mice." *J Periodontal Res* **42**(2): 97-103.
- Alliston, T. and R. Derynck (2002). "Medicine: interfering with bone remodelling." *Nature* **416**(6882): 686-687.
- Andrade, I., Jr., T. A. Silva, et al. (2007). "The role of tumor necrosis factor receptor type 1 in orthodontic tooth movement." *J Dent Res* **86**(11): 1089-1094.
- Bais, M. V., N. Wigner, et al. (2009). "BMP2 is essential for post natal osteogenesis but not for recruitment of osteogenic stem cells." *Bone* **45**(2): 254-266.
- Baker, A. H., D. R. Edwards, et al. (2002). "Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities." *J Cell Sci* **115**(Pt 19): 3719-3727.
- Bandyopadhyay, A., K. Tsuji, et al. (2006). "Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis." *PLoS Genet* **2**(12): e216.
- Bartold, P. M., R. I. Marshall, et al. (2005). "Periodontitis and rheumatoid arthritis: a review." *J Periodontol* **76**(11 Suppl): 2066-2074.
- Baumgartner, J. C., S. U. Khemaleelakul, et al. (2003). "Identification of spirochetes (treponemes) in endodontic infections." *J Endod* **29**(12): 794-797.
- Behl, Y., M. Siqueira, et al. (2008). "Activation of the acquired immune response reduces coupled bone formation in response to a periodontal pathogen." *J Immunol* **181**(12): 8711-8718.

- Bianco, P., B. Sacchetti, et al. (2011). "Osteoprogenitors and the hematopoietic microenvironment." Best Pract Res Clin Haematol **24**(1): 37-47.
- Bigda, J., I. Beletsky, et al. (1994). "Dual role of the p75 tumor necrosis factor (TNF) receptor in TNF cytotoxicity." J Exp Med **180**(2): 445-460.
- Bird, S. J. and M. B. Parlee (2000). "Of mice and men (and women and children): scientific and ethical implications of animal models." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **24**(8): 1219-1227.
- Birkedal-Hansen, H., W. G. Moore, et al. (1993). "Matrix metalloproteinases: a review." Crit Rev Oral Biol Med **4**(2): 197-250.
- Blum, I. R. (2002). "Contemporary views on dry socket (alveolar osteitis): a clinical appraisal of standardization, aetiopathogenesis and management: a critical review." Int J Oral Maxillofac Surg **31**(3): 309-317.
- Bodner, L., I. Kaffe, et al. (1993). "Extraction site healing in rats. A radiologic densitometric study." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **75**(3): 367-372.
- Bonewald, L. F. (2011). "The amazing osteocyte." J Bone Miner Res **26**(2): 229-238.
- Bosshardt, D. D. (2008). "Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels." J Clin Periodontol **35**(8 Suppl): 87-105.
- Bronckers, A. L. J. J., M. A. Engelse, et al. (2001). "Cell-specific patterns of Cbfa1 mRNA and protein expression in postnatal murine dental tissues." Mechanisms of Development **101**(1-2): 255-258.
- Brown, L. R., S. S. Merrill, et al. (1970). "Microbiologic study of intraoral wounds." J Oral Surg **28**(2): 89-95.
- Burger, E. H., J. Klein-Nulend, et al. (2003). "Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon--a proposal." J Biomech **36**(10): 1453-1459.
- Caetano-Lopes, J., H. Canhao, et al. (2009). "Osteoimmunology--the hidden immune regulation of bone." Autoimmun Rev **8**(3): 250-255.
- Carano, R. A. and E. H. Filvaroff (2003). "Angiogenesis and bone repair." Drug Discov Today **8**(21): 980-989.
- Cardaropoli, G., M. Araujo, et al. (2003). "Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs." J Clin Periodontol **30**(9): 809-818.
- Cardoso, C. L. (2009). Análise morfométrica e molecular da alveolite induzida em ratos com diferentes modalidades de tratamento. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo.

- Cardoso, C. L., O. Ferreira Junior, et al. (2011). "Experimental dry socket: microscopic and molecular evaluation of two treatment modalities." Acta Cir Bras **26**(5): 365-372.
- Cardoso, C. L., M. T. Rodrigues, et al. (2010). "Clinical concepts of dry socket." J Oral Maxillofac Surg **68**(8): 1922-1932.
- Carmody, E. E., E. M. Schwarz, et al. (2002). "Viral interleukin-10 gene inhibition of inflammation, osteoclastogenesis, and bone resorption in response to titanium particles." Arthritis Rheum **46**(5): 1298-1308.
- Carvalho, P. S. P. (1989). Influência da curetagem e irrigação e/ou aplicação de "Alveosan" sobre o processo de reparo em feridas de extração dental infectadas. Estudo histológico em ratos. Tese (Livre-Docência), Universidade Estadual Paulista.
- Chan, G. K. and G. Duque (2002). "Age-related bone loss: old bone, new facts." Gerontology **48**(2): 62-71.
- Claudino, M., T. P. Garlet, et al. (2010). "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 **118**(1): 19-28.
- Claudino, M., A. P. Trombone, et al. (2008). "The broad effects of the functional IL-10 promoter-592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3, and OPG expression and their association with periodontal disease outcome." J Leukoc Biol **84**(6): 1565-1573.
- Cohen, S. L., A. M. Moore, et al. (2004). "Interleukin-10 knockout mouse: a model for studying bone metabolism during intestinal inflammation." Inflamm Bowel Dis **10**(5): 557-563.
- Comarck, D. H. (1987). Ham's Histology. Bone. J. B. Lippincott, Philadelphia: 273-323.
- D'Antonio, G. M. (1984). Contaminação pós-exodôntica do alvéolo dental de ratos: estudo microbiológico e histológico. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista.
- Dai, J. and A. B. Rabie (2007). "VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification." J Dent Res **86**(10): 937-950.
- Dallas, S. L. and L. F. Bonewald (2010). "Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte." Ann N Y Acad Sci **1192**: 437-443.
- Dallas, S. L., M. Prideaux, et al. (2013). "The Osteocyte: An Endocrine Cell and More." Endocr Rev.
- Datta, H. K., W. F. Ng, et al. (2008). "The cell biology of bone metabolism." J Clin Pathol **61**(5): 577-587.

- de Melo Junior, E. J., M. J. Raposo, et al. (2002). "Medicinal plants in the healing of dry socket in rats: microbiological and microscopic analysis." Phytomedicine **9**(2): 109-116.
- de Oliveira, R. R., H. O. Schwartz-Filho, et al. (2009). "Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results." J Periodontol **80**(1): 98-105.
- Devlin, H., J. Hoyland, et al. (1997). "Trabecular bone formation in the healing of the rodent molar tooth extraction socket." J Bone Miner Res **12**(12): 2061-2067.
- Dimitriou, R., E. Tsiridis, et al. (2006). "The role of inhibitory molecules in fracture healing." Injury **37 Suppl 1**: S20-29.
- Dimitriou, R., E. Tsiridis, et al. (2005). "Current concepts of molecular aspects of bone healing." Injury **36**(12): 1392-1404.
- Dinareello, C. A. (2000). "Proinflammatory cytokines." Chest **118**(2): 503-508.
- Discepoli, N., F. Vignoletti, et al. (2013). "Early healing of the alveolar process after tooth extraction: an experimental study in the beagle dog." J Clin Periodontol **40**(6): 638-644.
- Dodson, T. (2013). "Prevention and treatment of dry socket." Evid Based Dent **14**(1): 13-14.
- Dresner-Pollak, R., N. Gelb, et al. (2004). "Interleukin 10-deficient mice develop osteopenia, decreased bone formation, and mechanical fragility of long bones." Gastroenterology **127**(3): 792-801.
- Ehnert, S., J. Baur, et al. (2010). "TGF-beta1 as possible link between loss of bone mineral density and chronic inflammation." PLoS One **5**(11): e14073.
- Eliseev, R. A., E. M. Schwarz, et al. (2006). "Smad7 mediates inhibition of Saos2 osteosarcoma cell differentiation by NFkappaB." Exp Cell Res **312**(1): 40-50.
- Elsubeihi, E. S. and J. N. Heersche (2004). "Quantitative assessment of post-extraction healing and alveolar ridge remodelling of the mandible in female rats." Arch Oral Biol **49**(5): 401-412.
- Evans, K. E. and S. W. Fox (2007). "Interleukin-10 inhibits osteoclastogenesis by reducing NFATc1 expression and preventing its translocation to the nucleus." BMC Cell Biol **8**: 4.
- Franz-Odenaal, T. A., B. K. Hall, et al. (2006). "Buried alive: how osteoblasts become osteocytes." Dev Dyn **235**(1): 176-190.
- Fukata, M., A. S. Vamadevan, et al. (2009). "Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders." Semin Immunol **21**(4): 242-253.

Garlet, G. P. (2004). Participação de citocinas na imunomodulação de doença periodontal experimental induzida por Actinobacillus actinomycetemcomitans. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo.

Garlet, G. P., M. J. Avila-Campos, et al. (2005). "Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration." Microbes Infect **7**(4): 738-747.

Garlet, G. P., C. R. Cardoso, et al. (2007). "The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction." Clin Exp Immunol **147**(1): 128-138.

Garlet, G. P., C. R. Cardoso, et al. (2006). "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 **21**(1): 12-20.

Garlet, T. P., U. Coelho, et al. (2007). "Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans." Eur J Oral Sci **115**(5): 355-362.

Gauldie, J., M. Jordana, et al. (1993). "Cytokines and pulmonary fibrosis." Thorax **48**(9): 931-935.

Genco, C. A., T. Van Dyke, et al. (1998). "Animal models for Porphyromonas gingivalis-mediated periodontal disease." Trends Microbiol **6**(11): 444-449.

Gersbach, C. A., B. A. Byers, et al. (2004). "Runx2/Cbfa1 stimulates transdifferentiation of primary skeletal myoblasts into a mineralizing osteoblastic phenotype." Experimental Cell Research **300**(2): 406-417.

Gerstenfeld, L. C., T. J. Cho, et al. (2001). "Impaired intramembranous bone formation during bone repair in the absence of tumor necrosis factor-alpha signaling." Cells Tissues Organs **169**(3): 285-294.

Gerstenfeld, L. C., T. J. Cho, et al. (2003). "Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption." J Bone Miner Res **18**(9): 1584-1592.

Giannoudis, P. V., T. A. Einhorn, et al. (2007). "Fracture healing: a harmony of optimal biology and optimal fixation?" Injury **38 Suppl 4**: S1-2.

Giannoudis, P. V., T. A. Einhorn, et al. (2007). "Fracture healing: the diamond concept." Injury **38 Suppl 4**: S3-6.

Gilbert, L., X. He, et al. (2000). "Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha." Endocrinology **141**(11): 3956-3964.

- Gilbert, L., X. He, et al. (2002). "Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha." J Biol Chem **277**(4): 2695-2701.
- Graves, D. T. and D. Cochran (2003). "The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction." J Periodontol **74**(3): 391-401.
- Graves, D. T. and Y. Jiang (1995). "Chemokines, a family of chemotactic cytokines." Crit Rev Oral Biol Med **6**(2): 109-118.
- Grewe, J. M. and W. J. Felts (1969). "The consequences of mandibular incisor extraction in the young mouse. I. Histologic aspects." J Dent Res **48**(4): 583-589.
- Guerreiro, R., Q. Santos-Costa, et al. (2011). "[The chemokines and their receptors: characteristics and physiological functions]." Acta Med Port **24 Suppl 4**: 967-976.
- Guo, R., M. Yamashita, et al. (2008). "Ubiquitin ligase Smurf1 mediates tumor necrosis factor-induced systemic bone loss by promoting proteasomal degradation of bone morphogenetic signaling proteins." J Biol Chem **283**(34): 23084-23092.
- Hadjidakis, D. J. and Androulakis, II (2006). "Bone remodeling." Ann N Y Acad Sci **1092**: 385-396.
- Haerian, A., E. Adonogianaki, et al. (1995). "Gingival crevicular stromelysin, collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases levels in healthy and diseased sites." J Clin Periodontol **22**(7): 505-509.
- Hankenson, K. D., M. Dishowitz, et al. (2011). "Angiogenesis in bone regeneration." Injury **42**(6): 556-561.
- Hatori, K., Y. Sasano, et al. (2004). "Osteoblasts and osteocytes express MMP2 and -8 and TIMP1, -2, and -3 along with extracellular matrix molecules during appositional bone formation." Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol **277**(2): 262-271.
- Haze, A., A. L. Taylor, et al. (2009). "Regeneration of bone and periodontal ligament induced by recombinant amelogenin after periodontitis." J Cell Mol Med **13**(6): 1110-1124.
- Henderson, B. and S. P. Nair (2003). "Hard labour: bacterial infection of the skeleton." Trends Microbiol **11**(12): 570-577.
- Herman, S., G. Kronke, et al. (2008). "Molecular mechanisms of inflammatory bone damage: emerging targets for therapy." Trends Mol Med **14**(6): 245-253.
- Holden, J. E. (2011). "Putting the bio in biobehavioral: animal models." West J Nurs Res **33**(8): 1017-1029.
- Horowitz, M. C., Y. Xi, et al. (2001). "Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands." Cytokine Growth Factor Rev **12**(1): 9-18.

- lizuka, S., Y. Kudo, et al. (2011). "Ameloblastin regulates osteogenic differentiation by inhibiting Src kinase via cross talk between integrin beta1 and CD63." Mol Cell Biol **31**(4): 783-792.
- Ito, A., B. F. Bebo, Jr., et al. (2001). "Estrogen treatment down-regulates TNF-alpha production and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in cytokine knockout mice." J Immunol **167**(1): 542-552.
- Jacobsson, S. A., K. Djerf, et al. (1994). "Effect of diclofenac on fixation of hydroxyapatite-coated implants. An experimental study." J Bone Joint Surg Br **76**(5): 831-833.
- Jiang, Y., L. Magli, et al. (1999). "Bacterium-dependent induction of cytokines in mononuclear cells and their pathologic consequences in vivo." Infect Immun **67**(5): 2125-2130.
- Jilka, R. L., B. Noble, et al. (2013). "Osteocyte apoptosis." Bone **54**(2): 264-271.
- Kalyvas, D. G. and M. Tarenidou (2008). "Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on osseointegration." J Oral Sci **50**(3): 239-246.
- Kanczler, J. M. and R. O. Oreffo (2008). "Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone." Eur Cell Mater **15**: 100-114.
- Kang, Y. J., S. J. Yang, et al. (2007). "A novel function of interleukin-10 promoting self-renewal of hematopoietic stem cells." Stem Cells **25**(7): 1814-1822.
- Kanyama, M., T. Kuboki, et al. (2003). "Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction." Arch Oral Biol **48**(10): 723-730.
- Karsenty, G. and E. F. Wagner (2002). "Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development." Dev Cell **2**(4): 389-406.
- Katagiri, T. and N. Takahashi (2002). "Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation." Oral Dis **8**(3): 147-159.
- Keramaris, N. C., G. M. Calori, et al. (2008). "Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF." Injury **39 Suppl 2**: S45-57.
- Knothe Tate, M. L., J. R. Adamson, et al. (2004). "The osteocyte." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **36**(1): 1-8.
- Kobayashi, R., T. Kono, et al. (2011). "Induction of IL-10-producing CD4+ T-cells in chronic periodontitis." J Dent Res **90**(5): 653-658.
- Koizumi, K., V. Poulaki, et al. (2003). "Contribution of TNF-alpha to leukocyte adhesion, vascular leakage, and apoptotic cell death in endotoxin-induced uveitis in vivo." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(5): 2184-2191.

- Korpi, J. T., P. Astrom, et al. (2009). "Healing of extraction sockets in collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8)-deficient mice." Eur J Oral Sci **117**(3): 248-254.
- Krane, S. M., M. H. Byrne, et al. (1996). "Different collagenase gene products have different roles in degradation of type I collagen." J Biol Chem **271**(45): 28509-28515.
- Kuroda, S., R. Wazen, et al. (2011). "Ameloblastin is not implicated in bone remodelling and repair." Eur Cell Mater **22**: 56-66; discussion 66-57.
- Lacey, D. C., P. J. Simmons, et al. (2009). "Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation." Osteoarthritis Cartilage **17**(6): 735-742.
- Lafleur, M. A., M. M. Handsley, et al. (2003). "Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis." Expert Rev Mol Med **5**(23): 1-39.
- Lalani, Z., M. Wong, et al. (2003). "Spatial and temporal localization of transforming growth factor-beta1, bone morphogenetic protein-2, and platelet-derived growth factor-A in healing tooth extraction sockets in a rabbit model." J Oral Maxillofac Surg **61**(9): 1061-1072.
- Lalani, Z., M. Wong, et al. (2004). "Spatial and temporal localization of secretory IgA in healing tooth extraction sockets in a rabbit model." J Oral Maxillofac Surg **62**(4): 466-472.
- Lalani, Z., M. Wong, et al. (2005). "Spatial and temporal localization of FGF-2 and VEGF in healing tooth extraction sockets in a rabbit model." J Oral Maxillofac Surg **63**(10): 1500-1508.
- Lee, S. H., T. S. Kim, et al. (2008). "Osteoimmunology: cytokines and the skeletal system." BMB Rep **41**(7): 495-510.
- Li, Y., G. Toraldo, et al. (2007). "B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo." Blood **109**(9): 3839-3848.
- Lieberman, J. R., A. Daluiski, et al. (2002). "The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications." J Bone Joint Surg Am **84-A**(6): 1032-1044.
- Lin, C. L., C. Moniz, et al. (1996). "Colitis causes bone loss in rats through suppression of bone formation." Gastroenterology **111**(5): 1263-1271.
- Lin, Z., H. F. Rios, et al. (2011). "Gene expression dynamics during bone healing and osseointegration." J Periodontol **82**(7): 1007-1017.
- Liu, J. C., C. J. Lengner, et al. (2011). "Runx2 protein expression utilizes the Runx2 P1 promoter to establish osteoprogenitor cell number for normal bone formation." J Biol Chem **286**(34): 30057-30070.

- Liu, R., H. S. Bal, et al. (2006). "Tumor necrosis factor-alpha mediates diabetes-enhanced apoptosis of matrix-producing cells and impairs diabetic healing." Am J Pathol **168**(3): 757-764.
- Lloyd, S. A., Y. Y. Yuan, et al. (2009). "Administration of high-dose macrophage colony-stimulating factor increases bone turnover and trabecular volume fraction." J Bone Miner Metab.
- Long, P., J. Hu, et al. (2001). "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 **80**(5): 1416-1420.
- Lorenzo, J. and Y. Choi (2005). "Osteoimmunology." Immunol Rev **208**: 5-6.
- Lorenzo, J., M. Horowitz, et al. (2008). "Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system." Endocr Rev **29**(4): 403-440.
- Lotze, M. T., H. J. Zeh, et al. (2007). "The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity." Immunol Rev **220**: 60-81.
- Mak, T. W., J. M. Penninger, et al. (2001). "Knockout mice: a paradigm shift in modern immunology." Nat Rev Immunol **1**(1): 11-19.
- Manolagas, S. C. (2000). "Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis." Endocr Rev **21**(2): 115-137.
- Mariano, R. C. (1991). Influência da "Rifocina M", associada ou não ao "Gelfoam", no processo de reparo alveolar em feridas de extração dental infectadas: estudo histológico em ratos. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista.
- Mariano, R. C. (1995). Estudo comparativo sobre a influência da limpeza cirúrgica associada a diferentes substâncias antimicrobianas, como soluções irrigadoras, no processo de reparo perturbado pela alveolite em ratos. Análises histológica e microbiológica. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista.
- Marsell, R. and T. A. Einhorn (2011). "The biology of fracture healing." Injury **42**(6): 551-555.
- Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." Annu Rev Immunol **12**: 991-1045.
- McCauley, L. K. and R. M. Nohutcu (2002). "Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy." J Periodontol **73**(11): 1377-1391.
- Meira, A. (1993). Influência da limpeza cirúrgica e irrigação e/ou aplicação tópica de uma associação de triancinolona e antimicrobianos sobre o processo de reparo em

feridas de extração dental infectadas. Estudo histológico em ratos. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista.

Menezes, R., T. P. Garlet, et al. (2008). "The potential role of suppressors of cytokine signaling in the attenuation of inflammatory reaction and alveolar bone loss associated with apical periodontitis." J Endod **34**(12): 1480-1484.

Mills, L. A. and A. H. Simpson (2012). "In vivo models of bone repair." J Bone Joint Surg Br **94**(7): 865-874.

Mitchell, R. (1986). "Treatment of fibrinolytic alveolitis by a collagen paste (Formula K). A preliminary report." Int J Oral Maxillofac Surg **15**(2): 127-133.

Mohamed, S. G., E. Sugiyama, et al. (2007). "Interleukin-10 inhibits RANKL-mediated expression of NFATc1 in part via suppression of c-Fos and c-Jun in RAW264.7 cells and mouse bone marrow cells." Bone **41**(4): 592-602.

Monjo, M., S. F. Lamolle, et al. (2008). "In vivo expression of osteogenic markers and bone mineral density at the surface of fluoride-modified titanium implants." Biomaterials **29**(28): 3771-3780.

Mukai, T., F. Otsuka, et al. (2007). "TNF-alpha inhibits BMP-induced osteoblast differentiation through activating SAPK/JNK signaling." Biochem Biophys Res Commun **356**(4): 1004-1010.

Nanes, M. S. (2003). "Tumor necrosis factor-alpha: molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology." Gene **321**: 1-15.

Neufeld, G., T. Cohen, et al. (1999). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors." FASEB J **13**(1): 9-22.

Nitzan, D., J. F. Sperry, et al. (1978). "Fibrinolytic activity of oral anaerobic bacteria." Arch Oral Biol **23**(6): 465-470.

Nitzan, D. W. (1983). "On the genesis of "dry socket"." J Oral Maxillofac Surg **41**(11): 706-710.

Noroozi, A. R. and R. F. Philbert (2009). "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 **107**(1): 30-35.

Nowzari, H., J. E. Botero, et al. (2008). "Microbiology and cytokine levels around healthy dental implants and teeth." Clin Implant Dent Relat Res **10**(3): 166-173.

O'Brien, C. A., T. Nakashima, et al. (2013). "Osteocyte control of osteoclastogenesis." Bone **54**(2): 258-263.

Ochi, H., Y. Hara, et al. (2010). "The roles of TNFR1 in lipopolysaccharide-induced bone loss: dual effects of TNFR1 on bone metabolism via osteoclastogenesis and osteoblast survival." J Orthop Res **28**(5): 657-663.

- Oertelt-Prigione, S. (2012). "Immunology and the menstrual cycle." Autoimmun Rev **11**(6-7): A486-492.
- Oertelt-Prigione, S. (2012). "The influence of sex and gender on the immune response." Autoimmun Rev **11**(6-7): A479-485.
- Offenbacher, S., B. M. Odle, et al. (1989). "Changes in cyclooxygenase metabolites in experimental periodontitis in Macaca mulatta." J Periodontol Res **24**(1): 63-74.
- Okamoto, T. and M. C. de Russo (1973). "Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats." Rev Fac Odontol Aracatuba **2**(2): 153-169.
- Okamoto, T. and A. C. Vasconcelos Fialho (1990). "[Comparative histological study of two methods of obtaining alveolar sections in rats]." Rev Odontol UNESP **19**(1): 63-74.
- Ominsky, M. S., C. Li, et al. (2011). "Inhibition of sclerostin by monoclonal antibody enhances bone healing and improves bone density and strength of nonfractured bones." J Bone Miner Res **26**(5): 1012-1021.
- Owens, J. M., A. C. Gallagher, et al. (1996). "IL-10 modulates formation of osteoclasts in murine hemopoietic cultures." J Immunol **157**(2): 936-940.
- Ozaki, Y., T. Ukai, et al. (2009). "Locally administered T cells from mice immunized with lipopolysaccharide (LPS) accelerate LPS-induced bone resorption." Bone **44**(6): 1169-1176.
- Ozdemir, A., M. A. Brown, et al. (1997). "Markers and mediators of inflammation in neonatal lung disease." Pediatr Pulmonol **23**(4): 292-306.
- Page-McCaw, A., A. J. Ewald, et al. (2007). "Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(3): 221-233.
- Pfizenmaier, K., H. Wajant, et al. (1996). "Tumor necrosis factors in 1996." Cytokine Growth Factor Rev **7**(3): 271-277.
- Phillips, A. M. (2005). "Overview of the fracture healing cascade." Injury **36 Suppl 3**: S5-7.
- Piccinini, A. M. and K. S. Midwood (2010). "DAMPening inflammation by modulating TLR signalling." Mediators Inflamm **2010**.
- Poleti, M. L. (2009). Análise morfométrica, radiográfica e molecular do processo de reparo alveolar após a terapia fotodinâmica antimicrobiana em ratos wistar. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo.
- Poole, K. E., R. L. van Bezooijen, et al. (2005). "Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation." FASEB J **19**(13): 1842-1844.

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

Reddi, A. H. and N. S. Cunningham (1993). "Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenetic proteins." J Bone Miner Res **8 Suppl 2**: S499-502.

Repeke, C. E., A. P. Trombone, et al. (2009). "Strong and persistent microbial and inflammatory stimuli overcome the genetic predisposition to higher matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) expression: a mechanistic explanation for the lack of association of MMP1-1607 single-nucleotide polymorphism genotypes with MMP-1 expression in chronic periodontitis lesions." J Clin Periodontol **36**(9): 726-738.

Ridderstad, A., M. Abedi-Valugerdi, et al. (1991). "Cytokines in rheumatoid arthritis." Ann Med **23**(3): 219-223.

Rodrigues, M. T., C. L. Cardoso, et al. (2011). "Experimental alveolitis in rats: microbiological, acute phase response and histometric characterization of delayed alveolar healing." J Appl Oral Sci **19**(3): 260-268.

Rodrigues, M. T. V. (2007). 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 (Mestrado), Universidade de São Paulo.

Rodrigues, M. T. V. C., C. L. ; Carvalho, P.S.P. ; Cestari, T. M. ; Feres, M ; Garlet, G. P. ; Ferreira Júnior, O. (2010). "Experimental alveolitis in rats: microbiological, acute phase response and delayed alveolar healing histometric characterization." Journal of Applied Oral Science **IN PRESS**.

Roschger, P., E. P. Paschalis, et al. (2008). "Bone mineralization density distribution in health and disease." Bone **42**(3): 456-466.

Rozanis, J., I. Schofield, et al. (1976). "Simulated dry socket: delayed healing of extraction wounds in rats." Dent J **42**(1): 41-45.

Rundle, C. H., X. Wang, et al. (2008). "Fracture healing in mice deficient in plasminogen activator inhibitor-1." Calcif Tissue Int **83**(4): 276-284.

Ryan, M. E., S. Ramamurthy, et al. (1996). "Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment." Curr Opin Periodontol **3**: 85-96.

Sabat, R. (2010). "IL-10 family of cytokines." Cytokine Growth Factor Rev **21**(5): 315-324.

Sasaki, H., Y. Okamatsu, et al. (2004). "The interleukin-10 knockout mouse is highly susceptible to Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss." J Periodontal Res **39**(6): 432-441.

- Scala, A., N. P. Lang, et al. (2013). "Sequential healing of open extraction sockets. An experimental study in monkeys." Clin Oral Implants Res.
- Schipani, E., C. Maes, et al. (2009). "Regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling by HIFs and VEGF." J Bone Miner Res **24**(8): 1347-1353.
- Schmidt-Bleek, K., H. Schell, et al. (2012). "Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade." Cell Tissue Res **347**(3): 567-573.
- Schroder, K. and J. Tschopp (2010). "The inflammasomes." Cell **140**(6): 821-832.
- Shin, H. H., J. E. Lee, et al. (2006). "Enhanced osteoclastogenesis in 4-1BB-deficient mice caused by reduced interleukin-10." J Bone Miner Res **21**(12): 1907-1912.
- Silva, T. A., G. P. Garlet, et al. (2007). "Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease." J Dent Res **86**(4): 306-319.
- Socransky, S. S. and A. D. Haffajee (2005). "Periodontal microbial ecology." Periodontol 2000 **38**: 135-187.
- Sodek, J. and M. D. McKee (2000). "Molecular and cellular biology of alveolar bone." Periodontol 2000 **24**: 99-126.
- Song, H. L., S. Lv, et al. (2009). "The roles of tumor necrosis factor-alpha in colon tight junction protein expression and intestinal mucosa structure in a mouse model of acute liver failure." BMC Gastroenterol **9**: 70.
- Spahr, A., S. P. Lyngstadaas, et al. (2006). "Ameloblastin expression during craniofacial bone formation in rats." Eur J Oral Sci **114**(6): 504-511.
- Stashenko, P., F. E. Dewhirst, et al. (1987). "Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption." J Immunol **138**(5): 1464-1468.
- Takayanagi, H. (2005). "Inflammatory bone destruction and osteoimmunology." J Periodontal Res **40**(4): 287-293.
- Takayanagi, H. (2007). "Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems." Nat Rev Immunol **7**(4): 292-304.
- Takayanagi, H. (2013). "Immunology and bone." J Biochem.
- Tamburstuen, M. V., S. Reppe, et al. (2010). "Ameloblastin promotes bone growth by enhancing proliferation of progenitor cells and by stimulating immunoregulators." Eur J Oral Sci **118**(5): 451-459.
- Tamburstuen, M. V., J. E. Reseland, et al. (2011). "Ameloblastin expression and putative autoregulation in mesenchymal cells suggest a role in early bone formation and repair." Bone **48**(2): 406-413.

- Tartaglia, L. A., R. F. Weber, et al. (1991). "The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(20): 9292-9296.
- Teitelbaum, S. L. (2000). "Bone resorption by osteoclasts." Science **289**(5484): 1504-1508.
- Theill, L. E., W. J. Boyle, et al. (2002). "RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution." Annu Rev Immunol **20**: 795-823.
- Tomomatsu, N., K. Aoki, et al. (2009). "LPS-Induced Inhibition of Osteogenesis is TNF-alpha-Dependent in a Murine Tooth Extraction Model." J Bone Miner Res.
- Tomomatsu, N., K. Aoki, et al. (2009). "LPS-induced inhibition of osteogenesis is TNF-alpha dependent in a murine tooth extraction model." J Bone Miner Res **24**(10): 1770-1781.
- Torres-Lagares, D., M. A. Serrera-Figallo, et al. (2005). "Update on dry socket: a review of the literature." Med Oral Patol Oral Cir Bucal **10**(1): 81-85; 77-81.
- Tsiridis, E., N. Upadhyay, et al. (2007). "Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules?" Injury **38 Suppl 1**: S11-25.
- Tsuji, K., A. Bandyopadhyay, et al. (2006). "BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing." Nat Genet **38**(12): 1424-1429.
- Visse, R. and H. Nagase (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." Circ Res **92**(8): 827-839.
- Volk, H., K. Asadullah, et al. (2001). "IL-10 and its homologs: important immune mediators and emerging immunotherapeutic targets." Trends Immunol **22**(8): 414-417.
- Vu, T. H. and Z. Werb (2000). "Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology." Genes Dev **14**(17): 2123-2133.
- Wada, T., T. Nakashima, et al. (2006). "RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease." Trends Mol Med **12**(1): 17-25.
- Winkler, D. G., M. K. Sutherland, et al. (2003). "Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist." EMBO J **22**(23): 6267-6276.
- Winkler, D. G., C. Yu, et al. (2004). "Noggin and sclerostin bone morphogenetic protein antagonists form a mutually inhibitory complex." J Biol Chem **279**(35): 36293-36298.
- Witte, M. B. and A. Barbul (1997). "General principles of wound healing." Surg Clin North Am **77**(3): 509-528.

Zambuzzi, W. F., K. B. Paiva, et al. (2009). "MMP-9 and CD68(+) cells are required for tissue remodeling in response to natural hydroxyapatite." J Mol Histo **40**(4): 301-309.

Zhou, F. H., B. K. Foster, et al. (2006). "TNF-alpha mediates p38 MAP kinase activation and negatively regulates bone formation at the injured growth plate in rats." J Bone Miner Res **21**(7): 1075-1088.

Apêndices

APÊNDICE

Símbolos e descrição dos genes presentes na placa de PCR Array

Símbolo	Descrição
Fatores de crescimento	
<i>Bmp3</i>	Bone morphogenetic protein 3
<i>Bmp4</i>	Bone morphogenetic protein 4
<i>Bmp5</i>	Bone morphogenetic protein 5
<i>Bmp6</i>	Bone morphogenetic protein 6
<i>Bmp7</i>	Bone morphogenetic protein 7
<i>Egf</i>	Epidermal growth factor
<i>Fgf1</i>	Fibroblast growth factor 1
<i>Fgf2</i>	Fibroblast growth factor 2
<i>Fgf3</i>	Fibroblast growth factor 3
<i>Tgfb1</i>	Transforming growth factor beta 1
<i>Vegfa</i>	Vascular endothelial growth factor A
<i>Vegfb</i>	Vascular endothelial growth factor B
Marcadores ósseos	
<i>Twist1</i>	Twist-related protein 1
<i>Alpl</i>	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
<i>Ahsg</i>	Alpha-2-HS-glycoprotein
<i>Ambn</i>	Ameloblastin
<i>Dmp1</i>	Dentin matrix protein 1
<i>Phex</i>	Phosphate regulating endopeptidase homolog
<i>Sost</i>	Sclerostin
<i>Vdr</i>	Vitamin D receptor
<i>Rankl</i>	Receptor activator of NF-κB
<i>Opg</i>	Osteoprotegerin
<i>Rank</i>	Receptor activator of NF-κB
<i>Ctsk</i>	Cathepsin K
Marcadores de matriz	
<i>Col1a2</i>	Collagen type I alpha 2
<i>Col2a1</i>	Collagen type II alpha 1
<i>Col4a2</i>	Collagen type IV alpha 2
<i>Col5a1</i>	Collagen type V alpha 1
<i>Mmp1</i>	Matrix metalloproteinase 1
<i>Mmp2</i>	Matrix metalloproteinase 2
<i>Mmp8</i>	Matrix metalloproteinase 8
<i>Mmp9</i>	Matrix metalloproteinase 9
<i>Mmp10</i>	Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)
<i>Serpine1</i>	Serine protease inhibitor
<i>Timp1</i>	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1
<i>Timp3</i>	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2

Símbolo	Descrição
Citocinas	
<i>Il1b</i>	Interleukin 1b
<i>Il2</i>	Interleukin 2
<i>Il4</i>	Interleukin 4
<i>Il6</i>	Interleukin 6
<i>Il10</i>	Interleukin 10
<i>Il12</i>	Interleukin 12
<i>Il17</i>	Interleukin 17
<i>Ifn</i>	Interferon
<i>Tnfa</i>	Tumor necrosis factor alpha
Receptores de quimiocina	
<i>Ccr2</i>	Chemokine receptor CCR2
<i>Ccr3</i>	Chemokine receptor CCR3
<i>Ccr4</i>	Chemokine receptor CCR4
<i>Ccr5</i>	Chemokine receptor CCR5
<i>Ccr6</i>	Chemokine receptor CCR6
<i>Ccr7</i>	Chemokine receptor CCR7
<i>Ccr8</i>	Chemokine receptor CCR8
<i>Ccr9</i>	Chemokine receptor CCR9
<i>Cxcr1</i>	Chemokine receptor CXCR1
<i>Cxcr3</i>	Chemokine receptor CXCR3
Quimiocinas	
<i>Ccl2</i>	Chemokine CCL2
<i>Ccl3</i>	Chemokine CCL3
<i>Ccl5</i>	Chemokine CCL5
<i>Ccl6</i>	Chemokine CCL6
<i>Ccl7</i>	Chemokine CCL7
<i>Ccl8</i>	Chemokine CCL8
<i>Ccl9</i>	Chemokine CCL9
<i>Ccl11</i>	Chemokine CCL11
<i>Ccl17</i>	Chemokine CCL17
<i>Ccl20</i>	Chemokine CCL20
<i>Ccl24</i>	Chemokine CCL24
<i>Ccl25</i>	Chemokine CCL25
<i>Cxcl1</i>	Chemokine CXCL1
<i>Cxcl4</i>	Chemokine CXCL4
<i>Cxcl5</i>	Chemokine CXCL5
<i>Cxcl10</i>	Chemokine CXCL10
<i>Cxcl11</i>	Chemokine CXCL11
<i>Cxcl12</i>	Chemokine CXCL12
<i>Cxcl13</i>	Chemokine CXCL13
<i>Cx3cl1</i>	Chemokine CX3CL1
Controle	
<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<i>Actb</i>	Beta-actin
<i>Hprt1</i>	Hipoxanthine phosphoribosyltransferase 1

Comparativo geral dos camundongos WT, TNFp55KO e IL10KO em condições homeostáticas (Controle) e infecciosas (Alveolite Experimental):

Figura 29. Análise comparativa da densidade de volume de diferentes parâmetros no reparo ósseo alveolar nos períodos experimentais de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós exodontia nos camundongos em condições homeostáticas WT-C, TNFp55KO-C e IL10KO-C, e infecciosas WT-A, TNFp55KO-A e IL10KO-A. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados.

Anexos

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

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

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

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 029/2009

Bauru, 06 de outubro de 2009.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado "*Caracterização morfolométrica e molecular do papel de citocinas pró e anti-inflamatórias no processo de reparo ósseo alveolar em condições homeostáticas e infecciosas*", de autoria de Andreia Espíndola Vieira foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprovando** o projeto foi aceito. "*ad referendum*" desta Comissão, considerando que não existem infrações éticas.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Docente do Departamento de Ciências Biológicas