Bruno Schneider Herrera

**“Óxido nítrico e periodontite experimental: caracterização
de mediadores intracelulares da atividade
osteoclastogênica, conseqüências locais e sistêmicas”**

**Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obter o Título de
Doutor em Ciências.**

Área de concentração: Farmacologia

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Nicolás
Muscará**

São Paulo

2008

RESUMO

HERRERA, B. S. **Óxido nítrico e periodontite experimental: caracterização de mediadores intracelulares da atividade osteoclastogênica, consequências locais e sistêmicas**. 2008. 100 f. Tese de doutorado (Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A doença periodontal é a doença crônica mais prevalente nas doenças orais. Dentre os mediadores desse processo contam-se a Resolvin E1 (RvE1), um mediador pró-resolução da inflamação capaz de diminuir a perda óssea secundária à doença periodontal em coelhos, e o óxido nítrico (NO), o qual pode ser produzido em grandes quantidades pela ação de citocinas e estimular a diferenciação e atividade osteoclástica. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da RvE1 em osteoclastos (OCs) em cultura e os mecanismos envolvidos, bem como o papel do NO na progressão da periodontite experimental em ratos e as alterações sistêmicas resultantes de danos oxidativos. A diferenciação de OCs foi induzida em células de medula óssea de camundongos C57BL/6 em cultura (7 dias) e tratadas com diferentes doses de RvE1. NFkB e Akt fosforilada foram analisadas por Western blotting e a expressão gênica de NO sintase (NOS) induzível (iNOS) por “real-time” PCR. A participação dos receptores ChemR23 e BLT-1 na resposta à RvE1 foi estudada em membranas isoladas de OCs empregando radioligantes. A perda óssea alveolar e danos em órgãos periféricos foram analisados em ratos com periodontite induzida por ligadura (P) e sob tratamento de longo prazo com o inibidor não-seletivo de NOS, L-NAME. Os animais receberam L-NAME durante as 2 semanas prévias à indução da periodontite e até o momento do sacrifício (3, 7 ou 14 após a ligadura). A perda óssea alveolar foi avaliada radiograficamente, e análises do conteúdo de proteínas contendo nitrotirosina (NT), espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARs) e atividade da mieloperoxidase (MPO) foram realizadas em amostras de coração, baço, rim, fígado e pulmão. RvE1 (3 ng/mL) através da ativação do receptor para BLT-1 (mas não ChemR23) inibiu a diferenciação e atividade de OCs ($p < 0,05$) após 5 ou 7 dias de cultura, assim como a fosforilação dos dois sítios da Akt e a

traslocação do NF- κ B para o núcleo, um evento chave tanto na diferenciação de OCs ($p<0,05$) como na diminuição da expressão de iNOS. *In vivo*, ratos P (dia 7) mostraram um aumento na expressão de NT cardíaca e MPO renal em comparação ao grupo Sham (S; $p<0,05$). L-NAME resultou em aumento de NT hepática no grupo P no dia 3 ($p<0,05$), mas diminuição da NT cardíaca no dia 7 ($p<0,01$). Em comparação ao grupo P, ratos P+LN mostraram um aumento significativo na MPO hepática, cardíaca e renal no dia 3 ($p<0,05$), mas diminuição de MPO (dia 7) e TBARs esplênico (dia 3, $p<0,05$). Em resumo, mostramos que a RvE1 ligando-se ao receptor para BLT-1 inibe a diferenciação e atividade de OCs interferindo com a sinalização de Akt e NF- κ B, e consequentemente inibindo a expressão da iNOS, e que o NO tem um papel central na periodontite, não só relacionado a consequências locais na perda óssea alveolar, como também em órgãos periféricos distantes.

Palavras chaves: Periodontite. Resolvin E1. Óxido nítrico. Osteoclastos.

ABSTRACT

HERRERA, B. S. **Nitric oxide and experimental periodontitis: characterization of intracellular mediators of osteoclastogenic activity, local and systemic consequences**. 2008. 100 f. Ph. D. Thesis (Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The periodontal disease is the most prevalent chronic disease in oral diseases. Among the mediators of this process, is the Resolvin E1 (RvE1), a novel mediator pro-resolving of inflammation that is capable to decrease alveolar bone loss secondary to periodontal disease in rabbits; and the nitric oxide (NO), that can be produced in large amount, induced by cytokines and it can stimulate the osteoclast differentiation and activity. The aim of this study is to investigate the effects of RvE1 on osteoclasts (OCs) culture and the pathway involved, also the role of NO in the progression of experimental periodontitis in rats and systemic alterations due to oxidative damage. The OCs differentiation was induced in bone marrow cell culture from C57BL/6 mice (7 days) and treated with various doses of RvE1. NFkB and Akt phosphorylation were analyzed with Western blotting and the genic expression of NO synthase (NOS) inducible (iNOS) with "Real Time" PCR. The role of receptors ChemR23 and BLT-1 was accessed in OCs isolated membranes performing radioligants. The alveolar bone loss and peripheral organ damage was assessed in rats with ligature-induced periodontitis (P) under a long-term treatment of a NOS inhibitor, L-NAME. The animals received L-NAME from two weeks prior to periodontitis induction and until their sacrifice (3, 7 and 14 days after ligature). The alveolar bone loss was evaluated radiographically, and the protein nitrotyrosine (NT) content, reactive species of thiobarbituric acid (TBARs) and myeloperoxidase activity (MPO) were analyzed in samples of heart, spleen, kidney, lungs and kidneys. RvE1 (3 ng/mL) trough BLT-1 receptor activation (but not ChemR23) inhibits the OCs differentiation and activity ($p < 0.05$) after 5 or 7 days of the culture, as well as the Akt phosphorylation and NF- κ B translocation to the nucleus, a key event both in OCs differentiation ($p < 0.05$) and iNOS expression decreases. *In vivo*, P rats (day 7) show an increase of heart NT and renal MPO,

but lower lung MPO activity in comparison to the Sham group (S; $p < 0.05$). L-NAME leads to an increase the liver NT expression in P rats on day 3 ($p < 0.05$), but decreases the cardiac NT on day 7 ($p < 0.01$). In comparison with the P group, P+LN rats showed significantly increased liver, heart and kidney MPO content on day 3 ($p < 0.05$), but lower lung MPO (day 7) and spleen TBARs (day 3) content ($p < 0.05$). In summary we have shown that RvE1 binding on BLT-1 receptor inhibits OCs differentiation and activity by interfering with Akt and NF- κ B signaling and consequently iNOS inhibition, and NO has a central role on periodontitis, not only related to the local consequences on alveolar bone resorption, but also on distant peripheral organs.

Key words: Periodontitis. Resolvin E1. Nitric oxide. Osteoclasts.

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é a doença crônica mais prevalente na dentição humana, sendo a chamada placa bacteriana, ou biofilme, seu agente etiológico (TAANI, 1997). A placa bacteriana é formada por um conjunto de bactérias, células epiteliais descamadas, leucócitos polimorfonucleares, micoplasmas, leveduras e protozoários (LINDLE, 1998).

A progressão das doenças periodontais se apresenta de forma muito variada, podendo ter períodos de atividade intensa, seguidos por intervalos de estagnação ou remissão, sendo sua evolução influenciada pelas células do sistema imunológico e pelos tipos de agressores microbianos envolvidos (CARRANZA e NEWMAN, 1997; GENCO et al., 1996).

Tradicionalmente é dividida em duas categorias principais: gengivite (doença gengival) e periodontite, na qual há envolvimento da estrutura de suporte do dente, o osso (CARRANZA e NEWMAN, 1997).

1.1 Características do periodonto humano sadio

O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo frouxo, que circunda as raízes dos dentes e une o cemento radicular ao osso alveolar. Este ligamento está incluído no espaço entre as raízes dos dentes e o osso alveolar, que circunda o dente até o nível aproximado de 1 mm na junção amelocementária. Ele é contínuo com o tecido conjuntivo supra-alveolar, tendo largura de proximadamente 0,25 mm. A presença do ligamento periodontal é essencial para a mobilidade do dente, que é, em grande parte, determinada pela largura, altura e qualidade desse ligamento (BHASKAR, 1989). A figura abaixo ilustra a anatomia dentária:

Figura 1: Anatomia dentária com as estruturas de suporte

1.2 Aspectos gerais da doença periodontal

A doença periodontal compreende o grupo de condições inflamatórias desses tecidos de suporte dos dentes que são causadas por bactérias.

É sugerido que pelo menos 2 fatores estejam envolvidos na resposta inflamatória que gera a perda de inserção:

- 1) a presença de bactérias e seus produtos, e;
- 2) a própria destruição tecidual causada pelas células de defesa do hospedeiro (FIGUEIREDO, 2002).

Podemos relacionar como fatores de risco a má higienização oral, sendo este o fator principal das periodontopatias, bem como a má nutrição, e os maus hábitos, como o fumo e a escovação traumática.

Temos também os fatores de risco relacionados a prevalência e gravidade da doença periodontal, tais como a idade (quanto maior a idade, maior a prevalência), o sexo (em geral, os homens apresentam maior prevalência e gravidade da doença), a raça (os negros têm maior prevalência quando comparados aos brancos), a educação, a renda (a doença periodontal é inversamente proporcional ao grau de escolaridade e renda) e a ocorrência nas diferentes áreas geográficas, como por exemplo, em termos mundiais, os Estados Unidos que ocupam uma posição relativamente inferior em magnitude e

prevalência da doença periodontal, quando comparado com América do Sul e Ásia (CARRANZA e NEWMAN, 1997).

A periodontopatia tem início com a placa dental, um biofilme associado ao hospedeiro, que se instala ao redor do dente e tecido gengival. Esse biofilme é formado por diferentes espécies bacterianas que interagem física e fisiologicamente entre si e com o dente.

É difícil responsabilizar patógenos específicos pela destruição do periodonto, visto que existem mais de 300 a 400 espécies na placa bacteriana (DUBREFUL et al., 1995). Como consequência, as patologias periodontais observadas não são resultado de uma única bactéria, e sim de uma associação bacteriana complexa, como no caso das gengivites em que a flora supragengival é muito abundante (SOOCRANSKY e HAFFAJEE, 1992).

No curso das periodontites, as taxas elevadas de certas espécies fazem com que sejam consideradas patógenos potenciais (LOESCHE, 1993). Muitas pesquisas sobre fatores de virulência enfocam propriedades das bactérias relacionadas à destruição dos tecidos do hospedeiro, que podem ser amplamente classificadas como degradantes do tecido do hospedeiro ou causadoras da liberação de substâncias biologicamente ativas das células do mesmo.

Alguns produtos bacterianos inibem o crescimento ou alteram o metabolismo das células nos tecidos do hospedeiro, incluindo produtos resultantes do metabolismo. Com isso, as enzimas produzidas por microorganismos periodontais formam uma classe importante de moléculas de destruição do tecido, particularmente o *Porphyromonas gingivalis*, na qual produz uma grande quantidade de proteases (incluindo tripsina e enzimas que degradam o colágeno), fibronectina e imunoglobulinas.

O sistema imune do hospedeiro envolve uma rede complexa de interações entre células e moléculas reguladoras. Uma interação bem caracterizada envolve a liberação de interleucina- α , fator de necrose tumoral (TNF), e prostaglandinas de macrófagos e monócitos expostos a toxinas bacterianas (lipopolissacarídeos), que têm o potencial de estimular a reabsorção óssea e ativar ou inibir outras células imunes do hospedeiro (CARRANZA e NEWMAN, 1997).

1.3 Fases da doença periodontal

1.3.1 Gengivite – Estágio I: Lesão inicial

As primeiras manifestações de inflamação gengival são alterações vasculares que consistem essencialmente em dilatação dos capilares e aumento do fluxo sanguíneo. Clinicamente, esta resposta inicial da gengiva à placa bacteriana não é evidente e é chamada *gengivite subclínica*.

Este estágio caracteriza-se pelo acúmulo inicial de linfócitos, seguido por um aumento da migração de leucócitos, cujo acúmulo no sulco gengival pode estar relacionado a um aumento no fluxo do líquido gengival para dentro do sulco (ATTSTROM e EGELBERG, 1970).

Dependendo da resposta do hospedeiro, essa lesão inicial pode retornar à homeostase ou evoluir para uma lesão inflamatória crônica; neste último caso, ocorre infiltrado de macrófagos e células linfóides nos dias seguintes.

1.3.2 Gengivite – Estágio II: Lesão precoce

Nesta fase há uma proliferação de capilares evidenciado clinicamente pelo aparecimento de eritema e sangramento à sondagem, além do aumento da taxa de destruição de colágeno, começando pela destruição do ligamento periodontal (PAQUETTE e WILLIAMS, 2000).

Estímulos quimiotáticos provenientes das bactérias envolvidas atraem células polimorfonucleares (PMNs) as quais ativam-se no processo de fagocitose, liberando lisossomos, enzimas proteolíticas e radicais livres de forma concomitante (LANGE e SCHROEDER, 1971).

1.3.3 Gengivite – Estágio III: Lesão estabelecida

Na gengivite crônica, os vasos sanguíneos ficam ingurgitados e congestionados, o retorno venoso é prejudicado e o fluxo sanguíneo torna-se lento, resultando em anoxemia gengival localizada. A lesão estabelecida pode ser descrita clinicamente como uma inflamação moderada a grave, havendo aumento

da destruição tecidual devido à collagenase produzida tanto por algumas bactérias bucais como pelos PMNs (PAQUETTE e WILLIAMS, 2000).

1.3.4 Gengivite – Estágio IV: Lesão avançada

Embora a periodontite seja uma doença infecciosa do tecido gengival, as alterações que ocorrem no osso são cruciais, pois a destruição óssea é a responsável pela perda do dente.

A quantidade de tecido ósseo é regulada por um equilíbrio de influências locais e sistêmicas e também pela formação e reabsorção óssea. Fatores locais, tais como a doença periodontal, levam à quebra desse equilíbrio. Essa destruição óssea não é um processo de necrose, pois envolve atividade de células vivas.

Embora o infiltrado inflamatório esteja concentrado no periodonto marginal, a reação é muito mais difusa, freqüentemente atingindo o osso. Essa inflamação gengival se estende ao longo dos feixes de fibras colágenas e segue o curso dos vasos sanguíneos, através dos tecidos frouxamente organizados que os rodeiam em direção ao osso alveolar (WEINMANN, 1941).

Após a inflamação atingir o osso, ela se estende por dentro dos espaços medulares e substitue a medula com um exsudato leucocitário fluido, provocando neoangiogênese e proliferação de fibroblastos.

Os osteoclastos multinucleados e os fagócitos mononucleados estão aumentados em número e as superfícies ósseas estão revestidas por reabsorções lacunares semelhantes a cavernas (CARRANZA e NEWMAN, 1997).

As células envolvidas na reabsorção óssea são os osteoclastos, que removem a porção mineral do osso; entretanto, as células mononucleares causam uma lacuna na matriz orgânica em degradação (HEERSCHKE, 1978).

As citocinas têm um papel importante no controle do processo inflamatório e homeostase tecidual. Periodontites, bem como qualquer outra doença inflamatória crônica, resulta em um desarranjo desses fatores no hospedeiro. A liberação de citocinas não é só controlada pelo hospedeiro, mas também, pela bactéria e seus produtos (HIROSE et al., 2001).

Quanto à produção de citocinas, as células PMN produzem interleucina 1 α , interleucina 1 β , fator de necrose tumoral (TNF α), interleucina 6, entre outras (GALBRAITH et al., 1997; HIROSE et al., 2001).

Pacientes portadores de doença periodontal ou de diferentes formas de doenças gengivais apresentam aumento das concentrações de interleucina 1 β e TNF α no fluido gengival. Essas citocinas têm a capacidade de estimular tanto a reabsorção óssea como a proliferação de fibroblastos; essa relação com a doença periodontal tem sido foco de intensas pesquisas (CARRANZA e NEWMAN, 1997; HEERSCHE, 1978; HIROSE et al., 2001; LOHINAI et al., 2001).

1.4 Tecido ósseo e células envolvidas

O osso é um tecido fisiologicamente dinâmico que é constantemente renovado, isto é, trata-se de um tecido biologicamente ativo capaz de se adaptar aos estímulos mecânicos e reparar lesões estruturais no processo de remodelação. A população celular que regula esse processo — os osteoblastos (OBs) e os osteoclastos (OCs) — são derivados de diferentes células precursoras e têm controles moleculares distintos (ROBLING et al., 2006).

As atividades de diferenciação celular e remodelação óssea dessas células são reguladas por uma ampla variedade de hormônios, mediadores inflamatórios e fatores de crescimento (SUDA et al., 1992). A quebra dessa homeostase resulta em uma série de lesões ósseas, como osteoporose e periodontite (OSIER e MARKS, 1992; ROODMAN, 1992). Durante a remodelação óssea, diferenciação e maturação, os osteoclastos são regulados por fatores derivados dos osteoblastos como a osteoprotegerina (OPG) e o ligante para o receptor ativado pelos ligantes de NF- κ B (RANKL; receptor activator of the NF- κ B ligand). A OPG é um membro da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNF) que regula negativamente a osteoclastogênese, inibindo local e sistematicamente a diferenciação das células precursoras em osteoclastos, interrompendo a interação osteoblasto-osteoclasto (SIMONET et al., 1997). O outro fator derivado do osteoblasto, o RANKL, é um importante regulador da osteoclastogênese, pois ao se ligar ao seu receptor RANK (receptor activator of the NF- κ B) induz a diferenciação osteoclástica de células hematopoiéticas e estimula sua atividade de reabsorção óssea (LACEY et al., 1998). Portanto, a atividade de reabsorção óssea de osteoclastos induzido diretamente por RANKL ou indiretamente por osteoblastos estimula aqueles a produzirem citocinas pró-inflamatórias. Essa

resposta ao RANKL é completamente inibida na presença da OPG (UDAGAWA et al., 1999) diminuindo e/ou inibindo a resposta inflamatória.

Inflamação é um mecanismo de resposta de proteção do hospedeiro a desafios externos e lesão no tecido que, se não controlado, pode levar à perda das estruturas, bem como perda de função. Durante o desenvolvimento da inflamação, diferentes tipos de sinalizações moleculares determinam a migração, ativação, proliferação, diferenciação ou resolução de fatores desse processo. Muitas respostas inflamatórias são limitadas ou resolvidas por si só, sugerindo a existência de antiinflamatórios e/ou mediadores pró-resolução endógenos durante o curso da inflamação.

1.5 Mediadores lipídicos pró-resolução da inflamação - Resolvina E1

Derivados do ácido graxo poliinsaturado ômega-3 (PUFA) como é o caso do ácido eicosapentaenóico (EPA), que são encontrados em óleos de peixes, são caracterizados por serem benéficos a uma grande variedade de doenças inflamatórias, como doenças cardiovasculares, aterosclerose (LIBBY, 2002a; LIBBY, 2002b), asma (NATHAN, 2002) e periodontite (HASTURK et al., 2006). Acredita-se que esses ácidos graxos atuem por inúmeros mecanismos, prevenindo a conversão do ácido araquidônico em eicosanóides pró-inflamatórios ou servindo de substrato alternativo para produtos menos potentes.

Dentre os produtos bioativos da transformação dos ácidos graxos ômega-3, encontra-se a família das resolvinas (Rv; séries E1 e D1), recentemente descoberta, e cuja produção ocorre como resultado da acetilação da cicloxigenase 2 (COX2) pela aspirina atuando na regulação dos sinais pró-inflamatórios (SERHAN et al., 2002). Arita e colaboradores (2005) mostraram a ação benéfica de RvE1 inibindo a produção de prostanoídes por meio da interação desse lipídio com o receptor ChemR23 (primeiro receptor descrito para a resolvina).

Recentemente, foi possível a síntese orgânica da RvE1 (ácido 5*S*, 12*R*, 18*R*-trihidroxi-6*Z*, 8*E*, 10*E*, 14*Z*, 16*E*-eicosapentaenóico), o que permitiu estudar de forma mais detalhada a sua ação no processo inflamatório, bem como os mecanismos moleculares envolvidos neste processo (ARITA et al., 2005a).

A RvE1 foi primeiramente descrita em exudatos inflamatórios de amostras de tecidos dorsais de camundongos ("punch"; SERHAM et al., 2000). RvE1 foi capaz

também de reduzir o infiltrado leucocitário e de proteger o animal de colite experimental (ARITA et al., 2005c), efeitos antagônicos àqueles observados em outros mediadores lipídicos pró-inflamatórios bem estabelecidos, tais como prostaglandinas e leucotrienos. Em um modelo experimental da doença periodontal, o tratamento tópico com RvE1 reduziu o infiltrado leucocitário e a inflamação induzida por *Porphyromonas gingivalis* (HASTURK et al., 2006). O uso tópico de RvE1 também previne a perda óssea alveolar diminuindo significativamente o número de osteoclastos (OCs) corados com TRAP (*tartrate-resistant acid phosphatase*; enzima marcadora de osteoclastos; HASTURK et al., 2006). A pergunta que se levanta sobre esta observação é se esse efeito protetor ósseo é mediado inteiramente pelo efeito antiinflamatório da RvE1, ou se ela tem efeitos diretos locais em osteoclastos durante o desenvolvimento da doença periodontal. Outros derivados lipídicos do PUFA como a prostaglandina E2 (PGE2) e o leucotrieno B4 (LTB4) têm ações diretas nos OCs além de seus efeitos pró-inflamatórios sistêmicos (RAISZ, 2005). Um aumento da ingestão de PUFA pode também influenciar o metabolismo ósseo, sendo que a relação entre PUFAs ω -6/ ω -3 na dieta leva a um aumento na relação ácido araquidônico/EPA no osso, aumentando a produção de PGE2 e diminuindo a formação óssea nos ratos (WATKINS et al., 2000). Além disso, o tratamento em culturas celulares de medula óssea com EPA, precursor de RvE1, diminui a diferenciação de OCs *in vitro*, implicando um efeito direto do lipídio em OCs (SUN et al., 2003). Na cavidade bucal, a dieta enriquecida em EPA reduz a atividade osteoclástica e a reabsorção óssea alveolar durante o movimento ortodôntico em dentes de ratos (WAMI-MORIMOTO et al., 1999). Entretanto, os mecanismos moleculares desses efeitos dos PUFAs em células ósseas não são bem conhecidos.

1.6 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é outro importante mediador inflamatório, o qual em quantidades fisiológicas, regula o tônus vascular, inibe a agregação e adesão plaquetária, e media intracelularmente os efeitos de aminoácidos excitatórios (KENDALL et al., 2001). Está bem estabelecido o fato de que a administração crônica de inibidores da NO sintase (NOS) em roedores leva ao desenvolvimento de um estado hipertensivo caracterizado pela disfunção endotelial (BAYLIS et al.,

1992; RIBEIRO et al., 1992), na qual pelo menos em humanos, pode ocorrer secundário a uma grande quantidade de desordens, tal como hiperlipidemia (SHIMOKAWA e VANHOUTTE, 1989), isquemia e reperfusão (KU, 1982), aterosclerose (VANHOUTTE e SHIMOKAWA, 1989) e tratamento periodontal intensivo (TONETTI et al., 2007).

Na atualidade, a relação entre o NO e a doença periodontal não está muito clara e há informações limitadas (e algumas vezes controversas) sobre sua produção na cavidade bucal. Por exemplo, foi reportado que as concentrações de íon nitrito em saliva de pacientes com periodontite são menores do que aquelas apresentadas por sujeitos saudáveis (AUER et al., 2001); em contrapartida, outros autores sustentam que a produção de NO estaria aumentada no tecido gengival de pacientes, com base no aumento observado nas concentrações dos aminoácidos L-arginina e L-citrulina, paralelo a um aumento de prostaciclina (MATEJKA et al., 1998). Contudo, estas afirmações não podem ser consideradas conclusivas sendo que existem outras vias metabólicas nas quais a L-arginina e a L-citrulina estão envolvidas; como por exemplo, a via do ciclo da uréia, na qual a expressão da enzima arginase encontra-se aumentada em processos inflamatórios (HESSE et al., 2001). Gyurko e colaboradores (2005) mostraram que o óxido nítrico proveniente da iNOS (óxido nítrico sintase induzível) induz perda óssea por meio da diferenciação osteoclástica durante o desenvolvimento ósseo, bem como após infecção bacteriana em periodontite induzida por *Porphyromonas gingivalis* em camundongos.

Uma das reações mais importantes descritas para o NO, é aquela que ocorre com o ânion superóxido (O_2^-) dando origem ao ânion peroxinitrito (PN). O PN é um potente agente oxidante que reage de forma complexa com diferentes biomoléculas, entre elas, compostos fenólicos como a tirosina, levando à formação de 3-nitrotirosina (NT). A NT é, portanto, um dos marcadores da síntese de peroxinitrito *in vivo* (BECKMAN et al., 1990).

Além disso, o óxido nítrico parece ser um importante regulador do metabolismo ósseo, pois Osteoblasto e osteoclasto não só produzem, mas também respondem ao NO. Possivelmente o NO em pequenas quantidades seja capaz de regular as funções osteoclásticas (HELFRISH et al., 1997; JUNG et al., 2003).

1.7 Relação doença periodontal e sistêmicas

Além disso, mediadores locais da doença periodontal são encontrados em fluidos corporais, tais como saliva e sangue mostrando que há uma resposta e consequências sistêmicas para uma doença anteriormente caracterizada como focal. No intuito de correlacionar doença periodontal com alterações sistêmicas, foi identificado que quando o indivíduo é acometido por doenças cardiovasculares ou cerebrovasculares há um aumento da interleucina 6 (IL-6), consequentemente aumento da proteína C-reativa (CRP), e acúmulo de neutrófilos (BERCK et al., 1990; BIASUCCI et al., 1996). Loos e colaboradores (2000) demonstram que periodontite induz um aumento dos níveis sistêmicos de CRP, IL-6 e neutrófilos. Estes mediadores inflamatórios aumentam os riscos de lesões de aterosclerose, e consequentemente o risco de lesões cardíacas ou cerebrovasculares (LOOS et al., 2000).

Quanto a alterações pulmonares, foi observado aumento das concentrações de histamina e IgE, tanto em saliva quanto em gengiva de pacientes com asma e periodontite (HYYPPA, 1981, HYYPPA, 1984). Outro aspecto interessante é a observação de que a doença periodontal esta relacionada com nascimentos prematuros de crianças com baixo peso, provavelmente devido à produção aumentada de mediadores inflamatórios na periodontite, tais como interleucina 1, TNF- α e prostaglandinas que também são fatores importantes no início do trabalho de parto (OFFENBACHER et al., 1995; COLLINS et al., 1994).

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que o NO desempenha um importante papel na periodontite, não só quanto aos efeitos locais na perda óssea alveolar, mas também sistêmicos, os quais são fortemente dependentes do órgão e da fase de desenvolvimento da doença periodontal. Assim, a presença de periodontite é um importante fator que pode determinar o curso de outras doenças que envolvem alterações na produção de NO (tais como doenças cardiovasculares, pneumonia bacteriana, entre outras) devido à bacteremia transitória, toxinas orais circulantes e ativação imunológica induzida pelos microorganismos orais (THODEN VAN VELZEN et al., 1984).

Com base nos resultados obtidos *in vitro*, podemos concluir que a RvE1 tem um papel importante na resolução da inflamação agindo sobre osteoclastos, inibindo a produção de NO proveniente de iNOS, o qual no futuro, pode ser mais uma opção para tratamento de doenças ósseas inflamatórias, tais como a periodontite, e as consequências sistêmicas.

REFERÊNCIAS*

- ANGELI, F.; VERDECCHIA, P.; PELLEGRINO, C.; PELLEGRINO, R. G.; PELLEGRINO, G.; PROSCIUTTI, L. GIANNONI, C.; CIANETTI, S.; BENTIVOGLIO, M.. Association between periodontal disease and left ventricle mass in essential hypertension. **Hypertension**, v. 41, n. 3, p. 488-92, 2003.
- ARITA, M.; BIANCHINI, F.; ALIBERTI, J.; SHER, A.; CHIANG, N.; HONG, S.; YANG, R.; PETASIS, N. A.; SERHAN, C. N. Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. **J. Exp. Med.**, v. 201, n. 5, p. 713-22, 2005.
- ARITA, M.; CLISH, C. B.; SERHAN, C. N. The contributions of aspirin and microbial oxygenase to the biosynthesis of anti-inflammatory resolvins: novel oxygenase products from omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 338, n. 1, p. 149-57, 2005.
- ARITA, M.; OHIRA, T.; SUN, Y. P.; ELANGOVAR, S.; CHIANG, N.; SERHAN, C. N. Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. **J. Immunol.**, v. 178, n. 6, p. 3912-7, 2007.
- ARITA, M.; YOSHIDA, M.; HONG, S.; TJONAHEN, E.; GLICKMAN, J. N.; PETASIS, N. A.; BLUMBERG, R. S.; SERHAN, C. N. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 102, n. 21, p. 7671-76, 2005.
- ATTSTROM, R.; EGELBERG, J. Emigration of blood neutrophils and monocytes into the gingival crevices. **J. Periodont. Res.**, v. 5, n. 1, p. 48-55, 1970.
- AUER, A.; ALEKSIC, J.; IVIC-KARDUM, M.; AUER, J.; CULO, F. Nitric oxide synthesis is decreased in periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, n. 6, p. 565-8, 2001.
- BACK, M.; BU, D. X.; BRANSTROM, R.; SHEIKINE, Y.; YAN, Z. Q.; HANSSON, G. K. Leukotriene B4 signaling through NF-kappaB-dependent BLT1 receptors on vascular smooth muscle cells in atherosclerosis and intimal hyperplasia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 102, n. 48, p. 17501-6, 2005.
- BAYLIS, C.; MITRUKA, B.; DENG, A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. **J. Clin. Invest.**, v. 90, n. 1, p. 278-81, 1992.
- BECKMAN, J. S.; BECKMAN, T. W.; CHEN, J.; MARSHAL, P. A.; FREEMAN, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 87, n. 4, p. 1620-4, 1990.
- BEIJAMIM, C. F.; FERREIRA, C. F.; CUNHA, F. Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **J. Infect. Dis.**, v. 182, n. 1, p. 214-23, 2000.
- BERK, B.; WEINTRAUB, W.; ALEXANDER, R. W. Elevation of C-reactive protein in "active" coronary disease. **Am. J. Cardiol.**, v. 65, n. 3, p. 168-72, 1990.
- BHASKAR, S. N. Em: **Histologia e Embriologia Oral de Orban**. 9ª Ed. Artes Médicas, São Paulo. 1989.
- BIASUCCI, L.; VITELLI, A.; LIUZZO, G.; ALTAMURA, S.; CALIGIURI, G.; MONACO, C.; REBUZZI, A. G.; CILIBERTO, G.; MASERI, A. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. **Circulation**, v. 94, n. 5, p. 874-7, 1996.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOYDE, A. Optical and scanning electron microscopy in the single osteoclast resorption assay. **Bone Miner.**, v. 20, n. 1, p. 109-10, 1993.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 7, n. 72, p. 248-54, 1976.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol.**, v. 78, n. 3, p. 206-9, 1982.

CARRANZA, F. A.; NEWMAN, M. G. Em: **Periodontia Clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

COLLINS, J. G.; WINDLEY, H. W. III; ARNOLD, R. R.; OFFENBACHER, S. Effects of a Porphyromonas gingivalis infection on inflammatory mediator response in pregnancy outcome in hamsters. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 10, p. 4356-61, 1994.

CROUCHER, P. I.; VEDI, S.; MOTLEY, R. J.; GARRHAN, N. J.; STATON, M. R.; COMPSTON, J. E. Reduced bone formation in patients with osteoporosis associated with inflammatory bowel disease. **Osteoporosis Int.**, v. 3, n. 5, p. 236-41, 1993.

DARLEY-USMAR, V. M.; HOGG, N.; O'LEARY, V. J.; WILSON, M. T.; MONCADA, S. The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. **Free Radic. Res. Commun.** v. 17, n. 1, p. 9-20, 1992

DATTA, S. R.; BRUNET, A.; GREENBERG, M. E. Cellular survival: a play in three Akts. **Genes Dev.**, v. 13, n. 22, p. 2905-2, 1999.

DAVIS, B. A.; SIPE, B.; GERSHAN, L. A.; FIACCO, G. J.; LORENZ, T. C.; JEFFREY, J. J.; PARTRIDGE, N. C. Collagenase and tissue plasminogen activator production in developing rat calvariae: normal progression despite fetal exposure to microgravity. **Calcif. Tissue Int.**, v. 63, n. 5, p. 416-22, 1998.

DI PAOLA, R.; MARZOCCO, S.; DATTOLA, F.; ROTONDO, F.; BRITTI, D.; DE MAJO, M.; GENOVESE, T.; CUZZOCREA, S. Effect of aminoguanidine in ligature-induced periodontitis in rats. **J. Dent. Res.**, v. 83, n. 4, p. 343-8, 2004.

DUBREFUL, L.; BASCONES, A. Infecciones Periodontales: Papel de los anaerobios estrictos, importancia de las Beta lactamasas, elección de um antibiotico. **Rev. Soc. Odontol. Plata**, n. 8, p. 21-34, 1995.

DUNCAN, C.; DOUGALL, H.; JOHNSTON, P.; GREEN, S.; BROGAN, R.; LEIFERT, C.; SMITH, L.; GOLDEN, M.; BENJAMIN, N. Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. **Nat. Med.**, v. 1, n. 6, p. 546-51, 1995.

DRAPER, H. H.; SQUIRES, E. J.; MAHMOODI, H.; WU, J.; AGARWAL, S.; HADLEY, M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 15, n. 4, p. 353-63, 1993.

EISERICH, J. P.; HRISTOVA, M.; CROSS, C. E.; JONES, A. D.; FREEMAN, B. A.; HALLIWELL, B.; VAN DER VLIET, A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. **Nature**, v. 391, n. 6665, p. 393-7, 1998.

FIGUEIREDO, C. M. S. **Gengivite x Periodontite**: Onde estamos agora? Disponível em: <www.odontologia.com.br>. Acesso em: 30 maio 2008.

FLYNN, M. A.; QIAO, M.; GARCIA, C.; DALLAS, M.; BONEWALD, L. F. Avian osteoclast cells are stimulated to resorb calcified matrices by and possess receptors for leukotriene B4. **Calcif. Tissue Int.**, v. 64, n. 2, p. 154-9, 1999.

GALBRAITH, G. M.; HAGAN, C.; STEED, R. B.; SANDERS, J. J.; JAVED, J. Cytokine production by oral and peripheral blood neutrophils in adult periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 68, n. 9, p. 832-7, 1997

GARCIA, C.; BOYCE, B. F.; GILLES, J.; DALLAS, M.; QIAO, M.; MUNDY, G. R.; BONEWALD, L. F. Leukotriene B4 stimulates osteoclastic bone resorption both in vitro and in vivo. **J. Bone Miner. Res.**, v. 11, n. 11, p. 1619-27, 1996.

GENCO, R. J.; COHEN, D. W.; GOLDMAN, H. M. Em: **Periodontia contemporânea**. São Paulo: Livraria Santos, 1996.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of medical physiology**. 9. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1996.

GYURKO, R.; SHOJI, H.; BATTAGLINO, R. A.; BOUSTANY, G.; GIBSON, F. C. 3RD; GENCO, C. A.; STASHENKO, P.; VAN DYKE, T. E. Inducible nitric oxide synthase mediates bone development and *P. gingivalis* induced alveolar bone loss. **Bone**, v. 36, n. 3, p. 472-9, 2005.

HASTURK, H.; KANTARCI, A.; OHIRA, T.; ARITA, M.; EBRAHIMI, N.; CHIANG, N.; PETASIS, N. A.; LEVY, B. D.; SERHAN, C. N.; VAN DYKE, T. E. RvE1 protects from local inflammation and osteoclast mediated bone destruction in periodontitis. **Faseb J.**, v. 20, n. 2, p. 401-3, 2006.

HEERSCHKE, J. N. M. Mechanism of osteoclastic bone resorption: A new hypothesis. **Calcif. Tissue Res.**, v. 26, n. 1, p. 81-4, 1978.

HELFRICH, M. H.; EVANS, D. E.; GRABOWSKI, P. S.; POLLOCK, J. S.; OHSHIMA, H.; RALSTON, S. H. Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. **J. Bone Miner. Res.**, v. 12, n. 7, p. 1108-15, 1997.

HESSE, M.; MODOLELL, M.; LA FLAMME, A. C.; SCHITO, M.; FUENTES, J. M.; CHEEVER, A. W.; PEARCE, E. J.; WYNN, T. A. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. **J. Immunol.**, v. 167, n. 11, p. 6533-44, 2001.

HIROSE, M.; ISHIHARA, K.; SAITO, A.; NAKAGAWA, T.; YAMADA, S.; OKUDA, K. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. **J. Periodontol.**, v. 72 n. 5, p. 590-7, 2001.

HOLZHAUSEN, M.; ROSSA JUNIOR, C.; MARCANTONIO JÚNIOR, E.; NASSAR, P. O.; SPOLIDÓRIO, D. M.; SPOLIDÓRIO, L. C. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 73, n. 9, p. 1030-6, 2002.

HOTOKEZAKA, H.; SAKAI, E.; OHARA, N.; HOTOKEZAKA, Y.; GONZALES, C.; MATSUO, K. I.; FUJIMURA, Y.; YOSHIDA, N.; NAKAYAMA, K. Molecular analysis of RANKL-independent cell fusion of osteoclast-like cells induced by TNF-alpha, lipopolysaccharide, or peptidoglycan. **J. Cell Biochem.**, v. 102, n. 1, p. 122-34, 2006.

HYPPA, T. Gingival IgE and histamine concentrations in patients with asthma and in patients with periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 11, n. 2, p. 132-7, 1984.

HYPPA, T. Studies of immunologic and inflammatory factors in saliva in patients with asthma and in patients with periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 8, n. 6, p. 500-7, 1981.

JUNG, J. Y.; LIN, A. C.; RAMOS, L. M.; FADDIS, B. T.; CHOLE, R. A. Nitric oxide synthase I mediates osteoclast activity in vitro and in vivo. **J. Cell. Biochem.**, v. 89, n. 3, p. 613-21, 2003.

KENDALL, H. K.; MARSHALL, R. I.; BARTOLD, P. M. Nitric oxide and tissue destruction. **Oral Dis.**, v. 7, n. 1, p. 2-10, 2001.

- KILINC, K.; KILINC, A.; WOLF, R. E.; GRISHAM, M. B. Myoglobin-catalyzed tyrosine nitration: no need for peroxynitrite. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 285, n. 2, p. 273-6, 2001.
- KOSONEN, O.; KANKAARANTA, H.; MALO-RANTA, U.; MOILANEN, E. Nitric oxide-releasing compounds inhibit neutrophils adhesion to endothelial cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 382, n. 2, p. 111-7, 1999.
- KOSONEN, O.; KANKAARANTA, H.; UOTILA, J.; MOILANEN, E. Inhibition by nitric oxide-releasing compounds of E-selectin expression in and neutrophil adhesion to human endothelial cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 394, n. 1, p. 149-56, 2000.
- KU, D. D. Coronary vascular reactivity after acute myocardial ischemia. **Science**, v. 218, n. 4572, p. 576-8, 1982.
- KUBES, P.; SZRUKI, M.; GRANGER, D. N. Nitric Oxide: An endogenous Modulator of Leukocyte adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, n. 11, p. 4651-5, 1991.
- LACEY, D. L.; TIMMS, E.; TAN, H. L.; KELLEY, M. J.; DUNSTAN, C. R.; BURGESS, T.; ELLIOTT, R.; COLOMBERO, A.; ELLIOTT, G.; HSU, H.; SULLIVAN, J.; HAKINS, N.; DAVY, E.; CAPPARELLI, C.; ELI, A.; QIAN, Y. X.; KAUFMAN, S.; SAROSI, I.; SHALHOUB, V.; SENALDDI, G.; GUO, J.; DELANEY, J.; BOYLE, W. J. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. **Cell**, v. 93, n. 2, p. 165-176, 1998.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970.
- LANGE, D.; SCHROEDER, H. E. Cytochemistry and ultrastructure of gingival sulcus cells. **Helv. Odontol. Acta**, v. 15, n. 6, p. 65-86, 1971.
- LEITE, C. L.; REDINGS, C. A.; VASQUES, E. C.; MEYRELLES, S. S. Experimental-induced periodontitis is exacerbated in spontaneously hypertensive rats. **Clin. Exp. Hypertens.**, v. 27, n. 6, p. 523-31, 2005.
- LIBBY, P. Atherosclerosis: the new view. **Sci. Am.**, v. 286, n. 5, p. 46-55, 2002.
- LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, n. , p. 868-74, 2002.
- LINDLE, J. **Tratado de periodontologia clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
- LOESCHE, W. J. Bacterial mediators in periodontal disease. **Clin. Infect. Dis.**, v. 16, n. 4, p. 203-10, 1993.
- LOHINAI, Z.; BENEDEK, P.; FEHER, E.; GYORFI, A.; ROSIVALL, L.; FAZEKAS, A.; SALZMAN, A. L.; SZABO, C. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 123, n. 3, p. 353-60, 1998.
- LOOS, B. G.; CRAANDIJK, J.; HOEK, F. J.; DILLEN, P. M. E. W.; VELDEN, U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in peripheral blood of periodontitis patients. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 10, p. 1528-34, 2000.
- MANCINI, L.; MORADI-BIDHENDI, N.; BECHERINI, L.; MARTINETI, V.; MACINTYRE, I. The biphasic effects of nitric oxide in primary rat osteoblasts are cGMP dependent. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 274, n. 2, p. 477-81, 2000.
- MATEJKA, M.; PARTYKA, L.; ULM, C.; SOLAR, P.; SINGER, H. Nitric oxide is increased in periodontal disease. **J. Periodontal Res.**, v. 33, n. 8, p. 517-8, 1998.

MCHUGH, K. P.; HODIVALA-DILKE, K.; ZHENG, M. H.; NAMBA, N.; LAM, J.; NOVACK, D.; FENG, X.; ROSS, F. P.; HYNES, R. O.; TEITELBAUM, S. L. Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 4, p. 433-40, 2000

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846-52, 2002

OFFENBACHER, S.; KATZ, V.; FERTIK, G.; COLLINS, J.; BOYD, D.; MAYNOR, G.; MCKAIG, R.; BECK, J. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. **J. Periodontol.**, v. 67, n. 10 (suppl), p. 1103-13, 1996.

OMORI, K.; NARUISHI, K.; NISHIMURA, F.; YAMADA-NARUISHI, H.; TAKASHIBA, S. High glucose enhances interleukin-6-induced vascular endothelial growth factor 165 expression via activation of gp130-mediated p44/42 MAPK-CCAAT/enhancer binding protein signaling in gingival fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 8, p. 6643-9, 2004.

OSIER, L. K.; MARKS, S. C. Osteopetrosis. In: RIFKIN, B. R.; GAY, C. V. **Biology and physiology of the osteoclasts**. Boca Raton: CRC Press, 1992. p. 433-453.

PAQUETTE, D. W.; WILLIAMS, R. C.. Modulation of host inflammatory mediators as treatment strategy for periodontal diseases. **Periodontol.** 2000, v. 10, n. 24, p. 239-252, 2000.

RAISZ, L. G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 12, p. 3318-25, 2005.

RALSTON, S. H.; TODD, D.; HELFRISH, M. H.; BENJAMIN, N.; GRABOWSKI, P. S. Human osteoblastic-like cells produce nitric oxide synthase and express inducible nitric oxide synthase. **Endocrinology**, v. 135, n. 1, p. 330-6, 1994.

RIBEIRO, M. O.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; LOVISOLO, S. M.; ZATZ, R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. **Hypertension**, v. 20, n. 3, p. 298-303, 1992.

ROBLING, A. G.; CASTILLO, B. A.; TURNER, C. H. Biomechanical and molecular regulation of bone remodelling. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 8, p. 455-98, 2006.

ROODMAN, G. D. The osteoclast in Paget's disease of bone. Biology and physiology of the osteoclasts. **Bone**, v. 19, n. 3, p. 209-12, 1992.

SALLAY, K.; SAVANI, F.; RING, I.; PHAM, P.; BEHLING, U. H.; NOWOTNY, A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. **J. Periodontal Res.**, v. 17, n. 3, p. 263-74, 1982.

SCHWAB, J. M.; CHIANG, N.; ARITA, M.; SERHAN, C. N. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. **Nature**, v. 447, n. 7146, p. 869-74, 2007.

SERHAN, C. N.; CLISH, C. B.; BRANNON, J.; COLGAN, S. P.; CHIANG, N.; GRONERT, K. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal anti-inflammatory drugs and transcellular processing. **J. Exp. Med.**, v. 192, n. 8, p. 1197-204, 2000.

SERHAN, C. N.; HONG, S.; GRONERT, K.; COLGAN, S. P.; DEVCHAND, P. R.; MIRICK, G.; MOUSSIGNAC, R. L. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammatory signals. **J. Esp. Med.**, v. 196, n. 8, p. 1025-37, 2002.

SHIMOKAWA, H.; VANHOUTTE, P. M. Impaired endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets and related vasoactive substances in porcine coronary arteries in hypercholesterolemia and atherosclerosis. **Circ. Res.**, v. 64, n. 5, p. 900-14, 1989.

SIMONET, W. S.; LACEY, D. L.; DUNSTAN, C. R.; KELLEY, M.; CHANG, M. S.; LUTHY, R.; NGUYEN, H. Q.; WOODEN, S.; BENNETT, L.; BOONE, T.; SHIMAMOTO, G.; DEROSE, M.;

ELLIOTT, R.; COLOMBERO, A.; TAN, H. L.; TRAIL, G.; SULLIVAN, J.; DAVY, E.; BUCAY, N.; RENSHAW-GEGG, L.; HUGHES, T. M.; HILL, D.; PATTISON, W.; CAMPBELL, P.; SANDER, S.; VAN, G.; TARPLEY, J.; DERBY, P.; LEE, R.; BOYLE W. J. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. **Cell**, v. 89, n. 2, p. 309-319, 1997.

SOOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. The bacterial etiology destructive periodontal disease: Current concepts. **J. Periodontol.**, v. 63, n. 4, p. 322-31, 1992.

SUDA, T.; TAKAHASHI, N.; MARTIN, T. J. Modulation of osteoclast differentiation. **Endocrinol. Rev.**, v. 13, n. 1, p. 66-79, 1992.

SUGATANI, T.; HRUSKA, K. A. Akt1/Akt2 and mammalian target of rapamycin/Bim play critical roles in osteoclast differentiation and survival, respectively, whereas Akt is dispensable for cell survival in isolated osteoclast precursors. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 5, p. 3583-9, 2005.

SUN, D.; KRISHNAN, A.; ZAMAN, K.; LAWRENCE, R.; BHATTACHARYA, A.; FERNANDES, G. Dietary n-3 fatty acid decrease osteoclastogenesis and loss of bone mass in ovariectomized mice. **J. Bone Miner. Res.**, v. 18, n. 7, p. 1206-16, 2003.

TAANI, D. S. Association between cigarette smoking and periodontal health. **Quintessence Int.**, v. 28, n. 8, p. 535-9, 1997.

TEIXEIRA, S. A.; CASTRO, G. M.; PAPES, F.; MARTINS, M. L.; ROGÉRIO, F.; LANGONE, F.; SANTOS, L. M.; ARRUDA, P.; DE NUCCI, G.; MUSCARÁ, M. N. Expression and activity of nitric oxide synthase isoforms in rat brain during the development of experimental allergic encephalomyelitis. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 99, n. 1, p. 17-25, 2002.

THODEN VAN VELZEN, S. K.; ABRAHAM-INPIIN, L.; MOORER, W. R. Plaque and systemic disease: a reappraisal of the focal infection concept. **J. Clin. Periodontol.**, v. 11, n. 4, p. 209-20, 1984.

TONETTI, M. S.; D'AIUTO, F.; NIBALI, L.; DONALD, A.; STORRY, C.; PARKAR, M.; SUVAN, J.; HINGORANI, A. D.; VALLANCE, P.; DEANFIELD, J. Treatment of periodontitis and endothelial function. **N. Engl. J. Med.**, v. 356, n. 9, p. 911-20, 2007.

UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N.; JIMI, E.; MATSUZAKI, K.; TSURUKAI, T.; ITOH, K.; NAKAGAWA, N.; YASUDA, H.; GOTO, M.; TSUDA, E.; HIGASHIO, K.; GILLESPIE, M. T.; MARTIN, T. J.; SUDA, T. Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. **Bone**, v. 25, n. 5, p. 517-523, 1999.

VAN'T HOF, R. J.; ARMOUR, K. J.; SMITH, L. M.; ARMOUR, K. E.; WEI, X. Q.; LIEW, F. Y.; RALSTON, S. H. Requirement of the inducible nitric oxide synthase pathway for IL-1 induced osteoclastic bone resorption. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, n. 14, p. 7993-8, 2000.

VAN'T HOF, R. J.; RALSTON, S. H. Nitric oxide and bone. **Immunology**, v. 103, n. 3, p. 25-61, 2001.

VANHOUTTE, P. M.; SHIMOKAWA, H. Endothelium-derived relaxing factor and coronary vasospasm. **Circulation**, v. 80, n. 1, p. 1-9, 1989.

WAMI-MORIMOTO, Y.; YAMAGUCHI, K.; TANNE, K. Influence of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid on experimental tooth movement in rats. **Angle Orthod.**, v. 69, n. 4, p. 365-71, 1999

WATKINS, B. A.; LI, Y.; ALLEN, K. G.; HOFFMANN, W. E.; SEIFERT, M. F. Dietary ratio of (n-6)/(n-3) polyunsaturated fatty acids alters the fatty acid composition of bone compartments and biomarkers of bone formation in rats. **J. Nutr.**, v. 130, n. 9, p. 2274-84, 2000.

WEINMANN, J. P. Progress of gingival inflammation into the supporting structures of the teeth. **J. Periodontol.**, n. 12, p. 71, 1941.

WITTAMER, V.; FRANSSEN, J. D.; VULCANO, M.; MIRJOLET, J. F.; LE POUL, E.; MIGEOTTE, I.; BRÉZILLON, S.; TYLDESLEY, R.; BLANPAIN, C.; DETHEUX, M.; MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; VASSART, G.; PARMENTIER, M.; COMMUNI, D. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. **J. Exp. Med.**, v. 198, n. 7, p. 977–985, 2003.