UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL

LETÍCIA ANDREOTTI BIGNARDI

**ESTUDO DO PAPEL DO EIXO IL-33/ST2 NA PROGRESSÃO DA LESÃO
PERIAPICAL EXPERIMENTAL**

Ribeirão Preto
2014

LETÍCIA ANDREOTTI BIGNARDI

**ESTUDO DO PAPEL DO EIXO IL-33/ST2 NA PROGRESSÃO DA LESÃO
PERIAPICAL EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sandra Yasuyo
Fukada Alves

Ribeirão Preto

2014

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Letícia Andreotti Bignardi

FICHA CATALOGRÁFICA

Bignardi, Letícia Andreotti

Estudo do papel do eixo IL-33/ST2 na progressão da lesão periapical experimental. Ribeirão Preto, 2014.

141 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Alves, Sandra Yasuyo Fukada

1. Interleucina-33. 2. Lesão periapical. 3. Osteoclastos 4. MMP9. 5. Catepsina K. KKa..

FOLHA DE APROVAÇÃO

Letícia Andreotti Bignardi. **Estudo do papel do eixo IL-33/ST2 na progressão da lesão periapical experimental**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Data da defesa: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

LETÍCIA ANDREOTTI BIGNARDI

DADOS CURRICULARES

Nascimento	14 de Novembro de 1989 – São João da Boa Vista/SP
Filiação	Maria Elisa Andreotti Bignardi Sérgio Tadeu Bignardi
2008 – 2011	Curso de Graduação Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
2012 – 2013	Aperfeiçoamento no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
2012 – 2014	Curso de Pós Graduação (Mestrado) em Odontologia Área de Concentração: Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/ USP
2013 – 2015	Curso de Especialização em Odontopediatria Associação Odontológica de Ribeirão Preto – Ribeirão Preto/SP

Aos meus pais **Maria Elisa Andreotti Bignardi** e **Sérgio Tadeu Bignardi**. Não existem palavras que possam descrever a gratidão que tenho por me conduzirem com tanto carinho nos caminhos da vida e por estarem sempre presentes. Agradeço por não medirem esforços para que eu chegasse até esta etapa. Por terem me ensinado a ser curiosa, a sonhar alto e a ter fé. Obrigada por serem meus exemplos, por poder me espelhar em vocês e sustentar minhas decisões nos valores pessoais que me ensinaram. Obrigada por me apoiarem em minhas escolhas e por lutarem comigo, sempre que possível. Se hoje escrevo esta dedicatória é porque consegui concluir mais esta fase, e acreditem, vocês fazem parte desta conquista, com vocês o caminho é mais leve e açucarado. Pai e mãe, obrigada por tudo, vocês não poderiam ter sido melhores para mim! Meu amor por vocês é eterno e incondicional.

À **Deus**, por ser meu refúgio. Por me lançar bênçãos tão abundantes e por me conceder todas as graças necessárias a meu estado de vida.

“Senhor meu Deus, Esteja comigo... A minha frente, para me guiar... ao meu lado, para me acompanhar... atrás de mim, para me proteger... e acima de mim, pare me abençoar... Amém!”

À **Nossa Senhora das Graças**, por conceder-me a força necessária para dedicar-me à esta Dissertação de Mestrado e por atender aos meus pedidos mais prementes.

Agradeço ao meu namorado **Guilherme Feliciano de Figueiredo**, por todo seu apoio nestes anos. Por ser meu precioso amigo, vibrar comigo em minhas vitórias e me ajudar a superar e levar de modo mais leve os problemas e preocupações. Obrigada por compreender as minhas ausências e por estar sempre perto, mesmo que não seja uma proximidade literal. Obrigada por ser um exemplo de dedicação, por me ensinar que por mais que pareçam inalcançáveis, devo lutar pelos meus sonhos, e dar o melhor de mim por eles. Ao seu lado sei que a felicidade é garantida, obrigada por ser meu companheiro! Te amo muito!

Agradeço à minha **família**, por ser muito mais do que simplesmente um conjunto de pessoas ligadas por laços de parentesco, mas por haver amor e ternura entre nós. Esta união é preciosa e eu sei que torceram e compartilharam comigo deste sonho! Muito obrigada!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço à minha orientadora **Sandra Yasuyo Fukada Alves**, por me ensinar muito mais do que pensei que seria capaz de aprender. Por ser um exemplo de pessoa, apaixonada pelo que faz. Por ser capaz de promover a curiosidade, para que sejamos capazes de ir em busca do conhecimento, não dando respostas prontas. “Não plantando, mas semeando.” Sem você professora, não teria chegado tão longe. Agradeço a você por sua amizade e por seu apoio. Cada linha desta dissertação faz parte da transformação pela qual você me fez passar. Minha eterna professora, os anos passarão, mas não me esquecerei de tudo o que me ensinou! Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus **professores da Odontopediatria**, inspiradores desde a minha graduação. Criadores de aulas impecáveis e com primorosas habilidades para transmitir conhecimento. Zelosos com seus alunos e pacientes. Grandes educadores, graças a vocês decidi tomar o caminho da Odontopediatria como meu. Os admiro e agradeço por todo carinho.

Agradeço aos professores do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto **Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha, Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira** em especial ao **Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho**. Tenho orgulho por tê-los conhecido. Admiro seus trabalhos como pesquisadores e professores. Agradeço seus conselhos, as dicas, e também por cederem seus laboratórios para o início de meu aprendizado.

Aos **funcionários** do Departamento de Clínica Infantil, aos funcionários do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina, aos funcionários do Bloco S da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, aos funcionários da Biblioteca Central da USP, aos funcionários dos biotérios Central, da Genética e da Farmácia, por serem atenciosos e por estarem sempre prontos e dispostos a ajudar.

Às técnica de laboratório **Adriana Luisa Gonçalves de Almeida, Giuliana Bertozi Francisco e Nilza Letícia Magalhães**, ao especialista em laboratório **Marco**

Antonio dos Santos e ao técnico de laboratório **Tadeu Franco Vieira**, por terem participado efetivamente dos experimentos, tirando minhas dúvidas e me ensinando.

Agradeço também às **amigas da Odontopediatria**, frutos de um doce encontro advindo de uma paixão em comum, as crianças. Acredito que todas compartilharam deste grande sonho de forma despretensiosa, mas pudemos crescer juntas, nos apoiamos e nos espelhamos umas nas outras. Obrigada minhas amigas, muito do que sou hoje também devo a vocês!

Aos meus amigos de laboratório, **Adriano, Bruna, Giselle, Lamis, Lucas, Marcela, Thaise**, por estarem presentes nos momentos corriqueiros e nos momentos importantes da minha vida. Obrigada pelas conversas, conselhos, almoços, risadas. Agradeço em especial à **Talita**, por sua amizade e por dividir comigo as mesmas experiências, preocupações, alegrias e por me ajudar com tanto empenho para que eu pudesse realizar os experimentos e concluir a dissertação. Vocês são especiais, obrigada pela ajuda na execução deste trabalho e pela força no dia a dia!

Agradeço à todos os **alunos do programa em Farmacologia** da Faculdade de Medicina da USP, por me acompanharem nos primeiros passos do mestrado, quando eu ainda sabia pouco sobre laboratórios, por terem paciência e prazer em ensinar. Pela amizade e preocupação. Vocês foram essenciais! Muito obrigada!

À **Amanda, Clízia, Mayara, Nayele e Thaís** pela amizade duradoura. Agradeço por torcerem por mim e por estarem sempre ao meu lado, me ajudando a

superar minhas inseguranças e dificuldades. Obrigada pelos momentos em que me fizeram esquecer minhas preocupações, mas também por me dar forças e compreender minhas ausências quando o trabalho é necessário. Vocês são especiais!

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro.

RESUMO

Bignardi, LA. **Estudo do papel do eixo IL-33/ST2 na progressão da lesão periapical experimental.** Ribeirão Preto, 2014. 141p. Dissertação [Mestrado] – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A citocina IL-33 apresenta papel dual e está envolvida com a resolução ou progressão de inúmeras doenças, além disso, acredita-se que a via IL-33/ST2 esteja envolvida no equilíbrio entre a atividade de osteoclastos e osteoblastos. O objetivo deste estudo foi avaliar o papel do receptor ST2 no desenvolvimento e progressão de lesões periapicais experimentalmente induzidas em camundongos. Lesões periapicais foram induzidas em primeiros molares inferiores de camundongos WT e ST2 *knockout* (KO). Decorridos 7 e 14 dias, as amostras de mandíbula foram submetidas às análises: determinação da área de lesão periapical em cortes histológicos e do volume por microtomografia computadorizada (μ CT); contagem de osteoclastos submetidos ao ensaio de histoenzimologia (TRAP); expressão gênica de marcadores osteogênicos e osteoclastogênicos por q-PCR; quantificação de neutrófilos por ensaio de mieloperoxidases. Os linfonodos foram submetidos à análise da expressão dos fatores transcricionais T-bet, GATA-3, RORc e Foxp-3 por q-PCR. Análise estatística utilizada foi One-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni. Aos 14 dias, observou-se maior extensão da lesão periapical em animais WT que em ST2KO ($p < 0,05$). O tamanho da lesão nos animais ST2KO permaneceu igual em função do tempo. Foi observada maior quantidade de neutrófilos na lesão do grupo WT aos 7 dias, em comparação aos animais ST2KO ($p < 0,05$). Na expressão de T-bet, GATA-3, RORc e Foxp-3 não foram observadas diferenças estatisticamente significantes. O número de osteoclastos contados nos animais ST2KO foi maior que o observado em WT aos 7 dias e aos 14 dias ($p < 0,05$). A expressão de Runx2 foi maior no grupo lesão dos animais ST2KO quando comparado a seu respectivo controle. Os outros marcadores relacionados com a formação óssea não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Dentre os marcadores relacionados com a reabsorção óssea, a catepsina K e o MMP-9 apresentaram maior expressão aos 14 dias, na lesão dos animais WT quando comparada à expressão na lesão dos animais ST2KO ($p < 0,05$). Com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que na ausência do receptor ST2 as lesões periapicais são menos extensas e embora em maior quantidade, os osteoclastos são menos ativos. Nossos resultados sugerem um importante papel da via IL-33/ST2 na ativação dos osteoclastos e desenvolvimento da lesão periapical.

Palavras-chave: lesão periapical, interleucina-33, osteoclasto, MMP9, catepsina K

ABSTRACT

Bignardi, LA. **Study of the role of the IL-33/ST2 axis in experimental periapical lesion induced in mice.** Ribeirão Preto, 2014. 141p. Dissertação [Mestrado] – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

The IL -33 cytokine presents a dual role and is involved either in the resolution and progression of many diseases. Furthermore, it is believed that this pathway is involved between osteoclast and osteoblast activity balance. The aim of this study was to evaluate the role of ST2 receptor in the development and progression of experimentally induced periapical lesions in mice. Periapical lesions were induced in first molars of WT and ST2 knockout (KO) mice. After 7 and 14 days, jaw samples were subjected to various analysis: determination of periapical lesions area by histology and volume by computed microtomography (μ CT); osteoclasts number by TRAP histoenzymology; osteogenic and osteoclastogenic markers expression by q-PCR; neutrophil quantification by myeloperoxidase activity. The expression of transcription factors T-bet, GATA-3, RORC and Foxp-3 in lymph nodes were analysed by q-PCR. Statistical analysis was done by One-way ANOVA and Bonferroni post-test. It was observed a greater extent in periapical lesions of WT compared to ST2KO animals at 14 days ($p < 0.05$). There is no progression in the lesion of ST2KO mice with the time. A larger number of neutrophils in WT group was observed, compared to ST2KO mice evaluated at 7 days ($p < 0.05$). The expression of T-bet, GATA-3, RORc and Foxp-3 were not statistically significant different among the groups. The number of osteoclasts in lesions of ST2KO animals were greater than the observed in WT, at 7 and 14 days ($p < 0.05$). Although, other osteogenic markers showed no statistically significant difference, Runx2 expression in ST2KO was higher in lesion side compared to control side at 14 days. The markers related to bone resorption, cathepsin K and MMP-9, were significantly abrogated in the lesion side of ST2KO mice, at 14 days ($p < 0.05$). Based on the results, it can be concluded that although larger amounts of osteoclast were counted in ST2KO, the lesion was less extensive and osteoclasts less active. It all suggests that the IL-33/ST2 pathway play an important role in osteoclasts activation and periapical lesion development.

Key words: periapical lesion, interleukin-33, osteoclast, MMP-9, cathepsin K

LISTA DE FIGURA

Figura 1.	Delimitação da região de interesse a ser analisada. Nas imagens acima estão representadas na figura A, em vermelho as secções que envolvem da esquerda para a direita, o início, o meio e o fim da raiz distal analisada. Em B, C e D estão as respectivas imagens obtidas.....	57
Figura 2.	Uma série representativa de secções coronais do primeiro molar com exposição pulpar, com um intervalo de aproximadamente 25 secções entre cada. Em vermelho, as áreas de reabsorção na região periapical que foram utilizadas no presente estudo.....	59
Figura 3.	Representação gráfica da expressão de IL-33 (% de GAPDH) avaliada na região periapical de dentes controles e com lesão periapical, de camundongos WT, nos períodos experimentais de 7, 10 e 14 dias. * $p < 0,05$, em relação a seu respectivo controle. # $p < 0,05$, em relação a lesão aos 7 e 10 dias. (n=5 a 6).....	67
Figura 4.	Representação gráfica da expressão de ST2 (% de GAPDH) avaliada na região periapical de dentes controles e com lesão periapical, de camundongos WT, nos períodos experimentais de 7, 10 e 14 dias. * $p < 0,05$, em relação a seu respectivo controle. # $p < 0,05$, em relação a lesão aos 7 e 10 dias. (n=5 a 6).....	68
Figura 5.	Representação gráfica da expressão de ST2 (% de GAPDH) avaliada na região periapical de dentes controles e com lesão periapical, de camundongos WT e ST2KO, no período experimental de 7 dias. * $p < 0,05$, em relação ST2KO controle e lesão. (n=5 a 6).....	69
Figura 6.	Fotomicrografias representativas de cortes histológicos da raiz distal de primeiros molares inferiores em que foi induzida a lesão periapical e controle, dos grupos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. Cortes corados com hematoxilina e eosina observados em microscopia convencional e fluorescente, nos quais foram avaliadas as características dos tecidos pulpares e periapicais e mensuradas as lesões periapicais. (aumento 10x)...	71
Figura 7.	Representação gráfica da área (μm^2) da lesão periapical de camundongos WT e ST2KO nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. * $p < 0,05$, em relação a seu respectivo controle. # $p < 0,05$, em relação a WT lesão aos 7 dias. + $p < 0,05$, em relação a WT lesão aos 14 dias. Experimento reproduzido 3 vezes (n=5 a 6).....	74

Figura 8.	Imagens representativas bidimensionais obtidas através do escaneamento da mandíbula de camundongos WT e ST2KO em microtomógrafo computadorizado, no período experimental de 7 dias. Secções centrais da raiz distal de primeiros molares inferiores, selecionadas para representar a porção de lesão periapical com maior extensão (em vermelho).....	75
Figura 9.	Imagens representativas bidimensionais obtidas através do escaneamento da mandíbula de camundongos WT e ST2KO em microtomógrafo computadorizado, no período experimental de 14 dias. Secções centrais da raiz distal de primeiros molares inferiores, selecionadas para representar a porção de lesão periapical com maior extensão (em vermelho).....	77
Figura 10.	Imagens representativas tridimensionais reconstruídas após escaneamento da mandíbula de camundongos WT e ST2KO em microtomógrafo computadorizado, no período experimental de 7 dias. Abertura central da raiz distal de primeiros molares inferiores, selecionada para possibilitar a comparação do volume das lesões periapicais com os controles.....	79
Figura 11.	Imagens representativas tridimensionais reconstruídas após escaneamento da mandíbula de camundongos WT e ST2KO em microtomógrafo computadorizado, no período experimental de 14 dias. Abertura central da raiz distal de primeiros molares inferiores, selecionada para possibilitar a comparação do volume das lesões periapicais com os controles.....	81
Figura 12.	Representação gráfica do volume de reabsorção óssea (pixels) da lesão periapical de camundongos WT e ST2KO nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. * $p < 0,05$, em relação a seu respectivo controle. # $p < 0,05$, em relação a WT lesão aos 14 dias. Experimento reproduzido 2 vezes (n=3).....	83
Figura 13.	Representação gráfica do número de neutrófilos (neutrófilos/mg de tecido), avaliados na região periapical de dentes controles e com lesão periapical, de camundongos WT e ST2KO nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. * $p < 0,05$, em relação a WT lesão aos 7 dias. # $p < 0,05$, em relação a WT lesão aos 14 dias. Experimento reproduzido 2 vezes (n=5 a 6).....	85
Figura 14.	Representação gráfica da expressão de T-bet (% de GAPDH) avaliado nos linfonodos ipsilaterais à hemimandíbula em que foi induzida a lesão periapical e à hemimandíbula controle de camundongos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. (n=10 a 12).....	86

Figura 15.	Representação gráfica da expressão de GATA-3 (% de GAPDH) avaliado nos linfonodos ipsilaterais à hemimandíbula em que foi induzida a lesão periapical e ao controle de camundongos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias (n=10 a 12)....	87
Figura 16.	Representação gráfica da expressão de RORc (% de GAPDH) nos linfonodos ipsilaterais à hemimandíbula em que foi induzida a lesão periapical e ao controle de camundongos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. (n=10 a 12).....	87
Figura 17.	Representação gráfica da expressão de Foxp-3 (% de GAPDH) avaliado nos linfonodos ipsilaterais à hemimandíbula em que foi induzida a lesão periapical e à hemimandíbula controle de camundongos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias (n=10 a 12).....	88
Figura 18.	Representação gráfica da expressão de Runx2 (% de GAPDH) avaliado na região periapical de dentes controles e com lesão periapical, de camundongos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. * $p < 0,05$, em relação a seu respectivo controle (n=10 a 12).....	89
Figura 19.	Representação gráfica da expressão de Osteocalcina e Colágeno I (% de GAPDH) avaliadas na região periapical de dentes controles e com lesão periapical, de camundongos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. (n=10 a 12).....	91
Figura 20.	Representação gráfica da expressão de Fosfatase alcalina (% de GAPDH) avaliada na região periapical de dentes controles e com lesão periapical, de camundongos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. (n=10 a 12).....	92
Figura 21.	Representação gráfica da expressão de RANK (% de GAPDH) avaliado na região periapical de dentes controles e com lesão periapical, de camundongos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. * $p < 0,05$, em relação a seu respectivo controle (n=10 a 12).....	93
Figura 22.	Representação gráfica da expressão de RANKL e OPG (% de GAPDH) avaliados na região periapical de dentes controles e com lesão periapical, de camundongos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. * $p < 0,05$ em relação a seu respectivo controle (n=10 a 12).....	94

Figura 23.	Representação gráfica da razão da expressão de RANKL/OPG (% de GAPDH) avaliada na região periapical de dentes controles e com lesão periapical, de camundongos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. * $p < 0,05$ em relação a seu respectivo controle (n=8 a 12).....	95
Figura 24.	Fotomicrografias de cortes histológicos da raiz distal de primeiros molares inferiores em que foi induzida a lesão periapical, representativos dos grupos WT e ST2KO, no período experimental de 14 dias. Cortes ensaiados para TRAP observados em microscopia convencional, nos quais foram contados os número de osteoclastos. As imagens em B e D representam as imagens indicadas nos quadrados em A e C, respectivamente, em aumento 20x.....	97
Figura 25.	Representação gráfica do número de osteoclastos detectados na reação de TRAP, presentes na lesão periapical de camundongos WT e ST2KO nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. * $p < 0,05$, em relação a seu respectivo controle. # $p < 0,05$, em relação à WT lesão aos 7 dias. + $p < 0,05$, em relação à WT lesão aos 14 dias. Experimento reproduzido 3 vezes (n=5 a 6).....	99
Figura 26.	Representação gráfica da expressão de Catepsina K e MMP-9 (% de GAPDH), avaliada na região periapical de dentes controles e com lesão periapical, de camundongos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. * $p < 0,05$, em relação a seus respectivos controles, # $p < 0,05$, em relação à WT lesão aos 14 dias (n=14 a 18).....	101

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	31
2. PROPOSIÇÃO.....	45
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
Animais.....	51
Modelo experimental.....	51
Protocolo de indução da lesão periapical.....	51
Processamento histotécnico e avaliação microscópica (HE e TRAP).....	52
Microtomografia computadorizada (μCT)	55
Coleta das amostras.....	61
Real time PCR.....	61
Ensaio de mieloperoxidases (MPO).....	63
Análise estatística.....	63
4. RESULTADOS.....	65
Participação da citocina IL-33 na progressão de lesões periapicais.....	67
Avaliação da participação da citocina IL-33 na resposta imune durante a progressão das lesões periapicais.....	84
Avaliação da participação da citocina IL-33 na osteogênese.....	89
Avaliação da participação da citocina IL-33 na osteoclastogênese e reabsorção óssea.....	92
5. DISCUSSÃO.....	103
6. CONCLUSÃO.....	115
7. REFERÊNCIAS.....	119
ANEXO.....	139

Introdução

Tecido e remodelação óssea

O tecido ósseo é composto por estruturas orgânicas altamente especializadas, que juntamente com a cartilagem formam o esqueleto. Os ossos apresentam inúmeras funções de fundamental importância para o bom funcionamento do corpo humano. Possibilitam a mobilidade, sustentação, proteção de órgãos vitais, além de manter constantes as concentrações de cálcio, fosfato e outros íons nos líquidos corporais (revisado por SEEMAN & DELMAS, 2006).

Embora o osso pareça ser metabolicamente inerte, na verdade é um órgão dinâmico e especializado, que sofre mudanças constantes para manter ou melhorar suas funções. Durante seu crescimento e desenvolvimento ocorre a modelação óssea, em que há a remoção de osso de um local e deposição de osso em outro local, até atingir forma e tamanho ideais. Uma vez que o esqueleto atinge a maturidade, o processo de modelação óssea dará lugar ao processo de remodelação óssea, assim denominado por promover a troca periódica de osso velho por osso novo no mesmo local (PARFITT, 1994), cujo objetivo é de reparar os danos provocados por fadiga, prevenir o envelhecimento excessivo e suas consequências (MAROTTI, 2000; MANOLAGAS, 2000).

Além disso, o processo de remodelação óssea também pode ser induzido por diferentes fatores, como anormalidades genéticas, deficiências nutricionais, desordens hormonais, uso de glicocorticóides e também alterações locais, como as que ocorrem em inflamações e infecções bacterianas, que promovem o

enfraquecimento ósseo, fraturas, deformidades ou ainda indução de uma lesão osteolítica (RAISZ, 1999).

O processo de remodelação óssea é um evento multicelular, controlado por células especializadas que compõe a unidade osteorremodeladora (BMU - Basic Multicellular Unit) (PARFITT, 1994). Desta fazem parte os osteoblastos e os osteoclastos, que atuam respectivamente na produção da parte orgânica da matriz; e na reabsorção do tecido ósseo (revisado por SEGOVIA-SILVESTRE et al., 2009). Interessantemente, estudos atuais indicam que as BMUs são controladas por osteócitos, que mesmo aprisionados na matriz óssea, são capazes de identificar estímulos e promover a homeostase óssea, regulando a remodelação óssea (BONEWALD, 2011; SCHAFFLER e KENNEDY, 2012).

A ativação dos osteoblastos, quando controlada pelos osteócitos envolve a via Wnt, denominada também Wnt/ β -catenina (KULAR et al., 2012). Esta via é regulada por mediadores ativadores e inibitórios, que atuam respectivamente na diferenciação e inibição da atividade dos osteoblastos (KRISHNAN et al., 2006). Existe também a ativação de osteoblastos de modo independente dos osteócitos. Neste processo ocorre a migração e proliferação de células osteoprogenitoras, controladas por uma cascata de eventos combinada a uma programação genética com a regulação de diferentes genes, citocinas, fatores de crescimento, além disso pode ser controlado por fatores sistêmicos e locais, entre eles hormônios como paratormônio, estrogênio, e calcitonina (SODEK e MCKEE, 2000).

A osteoclastogênese é regulada por duas citocinas essenciais para a diferenciação, a saber, o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e o RANKL (Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B) (WIKTOR-JEDRZEJCZAK et al, 1990; BOYLE et al., 2003). Ironicamente, os osteoblastos,

formadores de tecido ósseo, produzem RANKL e controlam a osteoclastogênese (TATSUMI et al., 2007; KULAR et al., 2012), bem como os osteócitos (NAKASHIMA et al. (2011) que expressam uma quantidade ainda maior de RANKL do que os osteoblastos, e desta forma, os osteócitos têm uma maior capacidade de coordenar a osteoclastogênese.

O RANKL ao se ligar em RANK (receptor de RANKL) presente na superfície de células precursoras, promove a ativação de várias vias de sinalização intracelular, como Fator Nuclear kappa B (NFkB), induzindo a diferenciação final dos osteoclastos (revisado por BLAIR et al., 2005; ASAGIRI e TAKAYANAGI, 2007).

No entanto, os osteoblastos além de estimular a diferenciação de osteoclastos também são capazes de inibir a diferenciação osteoclástica. Para isso produzem a osteoprotegerina (OPG), que se liga ao RANKL, prevenindo sua ligação com RANK (SIMONET et al., 1997) e limitando a taxa de formação de osteoclastos e de degradação óssea (YUN et al., 1998). Consequentemente, a razão RANKL/OPG é um grande determinante da taxa de reabsorção óssea.

Interessantemente, estudos detectaram que RANKL é expresso não somente por células estromais e osteoblastos, mas também por sinoviócitos e linfócitos presentes nos linfonodos e no timo. A descoberta de que células do sistema imune influenciam a fisiopatologia óssea, levou ao surgimento de uma nova área da ciência: a osteoimunologia.

Osteoimunologia

A osteoimunologia (AARON e CHOI, 2000) é um campo de pesquisa interdisciplinar. Este termo foi criado para conotar a área da ciência em que os

sistemas imunológico e esquelético interagem (TAKAYANAGI, 2005). Visto as semelhanças entre os dois sistemas, é possível considerar que ambos integram uma unidade funcional (GEUSENS e LEMS, 2011).

A descoberta inicial de que a interleucina-1 (IL-1), secretada por células do sistema imune estimuladas por antígeno, poderia ser também um fator de ativação de osteoclastos (GOWEN et al., 1983), deu início a inúmeros estudos. Tal constatação evidenciou que as células ósseas e os componentes do sistema imune apresentam semelhanças funcionais, pois compartilham as mesmas moléculas reguladoras como citocinas, receptores, moléculas sinalizadoras e fatores de transcrição (TAKAYANAGI, 2005).

Além disso, o osso e o sistema imune compartilham a mesma origem (SUGIYAMA e NAGASAWA, 2012), uma vez que as células tronco mesenquimais provenientes da medula óssea se diferenciam em osteoblastos, osteócitos e células tronco hematopoiéticas. Estas últimas originam células progenitoras mielóides, se diferenciam em osteoclastos e células progenitoras linfóides, que darão origem às células do sistema imunológico (NAKASHIMA et al., 2011).

Atualmente, importantes descobertas vêm sendo realizadas, identificando citocinas e quimiocinas produzidas por células do sistema imunológico como moduladoras das células do tecido ósseo (DZIAK, 2013) e *vice-versa*. Sabe-se que o metabolismo ósseo pode ser modulado pela interferência em diferentes estágios de formação das células que participam deste processo, seja alterando o recrutamento de células precursoras, a diferenciação e ativação dos osteoclastos ou ainda por modular a atividade dos osteoblastos, alterando sua capacidade de formação óssea ou de controle da diferenciação de osteoclastos.

Neste sentido, há evidências de que a fisiologia e patologia de um sistema obrigatoriamente afetariam o outro (AARON e CHOI, 2000). Portanto, frente aos consistentes avanços na área da saúde e ao aumento no diagnóstico de condições patológicas que promovem a acelerada perda de tecido ósseo, a identificação de citocinas e o mecanismo pelo qual elas regulam a atividade osteoblástica e osteoclástica é de fundamental importância clínica, uma vez que essas moléculas e seus receptores podem apresentar excelentes alvos terapêuticos para distúrbios ósseos.

Lesão periapical e a osteoimunologia

O desenvolvimento e a homeostase do sistema esquelético dependem de uma remodelação óssea equilibrada, ou seja, de uma dinâmica balanceada entre a atividade dos osteoblastos e osteoclastos, as quais são estreitamente controladas pelo sistema imune. Em situações fisiológicas os processos de reabsorção e formação ósseas são fenômenos equilibrados e dependentes.

Por outro lado, o desequilíbrio no mecanismo de regulação das células ósseas por células do sistema imune, se aplica a inúmeras condições patológicas (TAKAYANAGI, 2012). Assim como em algumas situações patológicas com inflamação crônica, onde há o desequilíbrio da atividade dos osteoclastos sobre a dos osteoblastos resultando em reabsorção óssea patológica.

No presente projeto daremos enfoque, em particular a uma patologia que está associada com a perda óssea: a lesão periapical.

A lesão periapical é um processo imune e inflamatório (GAZIVODA et al., 2009), em que injúrias ao tecido pulpar levam à sua necrose e promovem progressivamente a destruição dos tecidos periapicais, que compreendem cemento, ligamento periodontal e osso alveolar. A destruição destas estruturas reduz a estabilidade dental, o que potencializa a possibilidade de sua perda (NAIR, 1997).

A necrose pulpar é resultante de uma invasão bacteriana no tecido pulpar, que pode ocorrer por processos cariosos, traumáticos ou iatrogênicos (STASHENKO et al., 1998). No entanto, é importante compreender que além da agressão gerada diretamente pelas bactérias no tecido pulpar, por meio de toxinas e produtos de seu metabolismo, há também o dano tecidual decorrente da resposta imunopatológica do hospedeiro (ROCHA et al., 2007), cujo mecanismo de defesa se torna tão severo na tentativa de proteger o organismo contra a multiplicação e ação dos microorganismos, que passa a ser prejudicial e danifica células e estruturas vizinhas (FUKADA et al., 2009; MENEZES-SILVA et al., 2012).

Contudo, caso as bactérias do tecido pulpar não sejam removidas, ocorrerá a necrose pulpar e a progressão de um processo inflamatório que extravasará pelo forame apical. As células inflamatórias e mediadores (NAIR, 1997), atingindo os tecidos periapicais e o osso alveolar circundante, promovem uma gradual reabsorção e destruição destes tecidos (STASHENKO et al., 1992; NAIR, 1997; TAKAHASHI, 1998).

Em destaque, intensamente envolvidas na progressão da lesão periapical, estão as bactérias Gram-negativas, que invadem o sistema de canais radiculares e os tecidos periapicais (LEONARDO et al., 2002; ROCHA et al., 2008). Estas apresentam em sua parede celular o LPS (lipopolissacarídeo), uma endotoxina bacteriana que

promove a ativação do sistema imunológico, para combater estes agentes patogênicos (METZGER, 2000; ROCHA et al., 2007) e que também leva a eventos importantes para o início e a progressão da lesão periapical (BARTHEL et al., 1997).

O tecido lesado e o LPS bacteriano promovem a ativação do sistema complemento e a produção de fatores quimiotáticos, que induzem a quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares ou neutrófilos para as regiões periapicais invadidas pelos patógenos (STASHENKO et al., 1994; MÁRTON e KISS, 2000). Os neutrófilos são os primeiros agentes da resposta imune inata e sua função é eliminar estes patógenos invasores. No entanto, estudos também associam a ação de enzimas produzidas pelos neutrófilos com a expansão das lesões periapicais e com as reabsorções ósseas (MARIMOTO et al., 2008). A atividade dos neutrófilos é determinada por um marcador, a mieloperoxidase (MPO), uma enzima específica que se localiza no interior destas células (MULLANE et al., 1985).

Com a progressão da doença, os neutrófilos são substituídos por células da linhagem monocítica/macrofágica (KUO et al., 1998) e os elementos da resposta imune inata são substituídos por elementos da resposta adaptativa, da qual fazem parte e predominam, os linfócitos T e B (JANEWAY et al., 2007).

Estudos vêm relacionando a resposta de células T à lesão periapical, uma vez que as células T helper 1 (Th1) comumente desenvolvem respostas pró-inflamatórias, as células T helper 2 (Th2) tendem a respostas anti-inflamatórias (BERGER, 2000) e ambas podem ser reguladas pelo grupo de células T reguladoras (Treg). Um outro padrão de resposta descoberto é promovido pelas células Th17, que produzem as citocinas IL-17 e estão relacionadas com respostas pró-inflamatórias. Os fatores transcricionais relacionados com estas respostas, são

respectivamente T-bet, GATA-3, Foxp-3 e RORc (revisado por GRAUNAITE et al., 2011).

A progressão do processo infeccioso, inflamatório e imune atinge então uma fase em que as citocinas anti-inflamatórias ou pró-inflamatórias produzidas por células T helper e por diferentes fontes celulares, desempenham papéis fundamentais na inibição ou ativação de osteoblastos e osteoclastos, e controlam por consequência, os processos de formação e reabsorção óssea. Neste sentido, pesquisas buscam caracterizar a etiopatogenia da doença periapical por meio do estudo de diferentes células, citocinas e vias envolvidas na modulação do metabolismo ósseo (GARLET et al., 2012). Além disso, marcadores bioquímicos e moleculares do metabolismo ósseo vêm sendo empregados para avaliar os elementos envolvidos no equilíbrio ou desequilíbrio entre as células ósseas (VIEIRA, 1999).

Dentre todos os fatores fundamentais envolvidos na formação óssea, o Runx2 (*Runt-related transcription factor 2*) é um dos mais importantes (ZHANG et al., 2009). Este é um fator de transcrição específico expresso por osteoblastos a partir de seus precursores mesenquimais (FRANCESCHI et al., 2009). Runx2 também regula a expressão de genes responsáveis pela produção de osteocalcina, a fosfatase alcalina e o colágeno tipo I, envolvidos com a diferenciação e/ou mineralização do tecido ósseo, estando diretamente relacionados com a formação óssea (VIEIRA, 1999).

Entretanto, envolvidas na osteoclastogênese, estão a via reguladora do desenvolvimento e ativação de osteoclastos RANK/RANKL/OPG (BOYCE et al., 2007)

e as enzimas catepsina K e MMP-9, envolvidas na degradação da matriz óssea em contextos fisiológicos e patológicos (revisado por PARK et al., 2013).

Ao relacionar estas moléculas específicas com as lesões periapicais, estudos relatam que há uma maior expressão de RANKL na lesão periapical (GARLET et al., 2004; COCHRAN, 2008; LEIBBRANDT e PENNINGER, 2008). A catepsina K, quando silenciada, reduz significativamente a reabsorção óssea e desenvolvimento de lesões periapicais (GAO et al., 2013). E as MMPs (metaloproteinases de matriz) estão associadas com altos níveis de inflamação e reabsorção óssea (HILL et al., 1994) e segundo a literatura são importantes no desenvolvimento das lesões periapicais (CARNEIRO et al., 2009; COROTTI et al., 2009).

A interleucina-33 (IL-33) é um membro da família da IL-1 com características não-convencionais: é uma citocina com papel dual, sendo capaz de promover a resolução de uma inflamação ou de estabelecer uma patologia. (MILLER, 2011). Não existem relatos na literatura correlacionando a IL-33 com o desenvolvimento e progressão de lesões periapicais. No entanto, inúmeros estudos vêm buscando compreender o papel que esta citocina exerce em diferentes contextos patológicos, visto que, uma vez liberada, a IL-33 atua em uma gama de células do sistema imunológico, sendo capaz de agir tanto em células do sistema imune inato, quanto adaptativo (LIEW et al., 2010).

Na literatura a IL-33 é apontada como um potencial alvo terapêutico para diversas patologias, dentre as quais estão a asma (SCHMITZ et al., 2005; OBOKI et al., 2011), outras doenças alérgicas (SCHMITZ et al., 2005; HAENUKI et al., 2012), aterosclerose (MILLER et al., 2008; MILLER e LIEW, 2011), artrite reumatóide (CARRIERE et al., 2007; YUAN et al., 2011), doenças cardiovasculares (SANADA et

al., 2007; KAKKAR e LEE, 2008), doenças inflamatórias do intestino (SPONHEIM et al., 2010; PASTORELLI et al., 2010), mal de Alzheimer (CHAPUIS et al., 2009; YU et al., 2012), sepse (ALVES-FILHO et al., 2010), e outras.

Pertence à família da IL-1, a qual inclui a IL-1 α , IL-1 β e IL-18 (SCHMITZ et al., 2005), cujos membros são conhecidos por alterar a resposta de um hospedeiro frente a desafios inflamatórios, infecciosos ou imunológicos (DINARELLO, 1994, 2000) e liga-se ao receptor ST2 (TOMINAGA, 1989, LIEW et al., 2010). Atualmente sabe-se que o gene do receptor ST2 codifica, ao menos, 3 isoformas de proteína, dentre as quais estão a isoforma ligada à membrana, uma forma variante e uma forma solúvel (TAGO et al., 2001). A isoforma ligada à membrana é expressa em inúmeros tipos celulares, mas tem sua maior expressão em mastócitos e células Th2 (THOMASSEN et al., 1995; XU et al., 1998; LIEW et al., 2010; SCANLON e MCKENZIE, 2012). Quando expresso na isoforma solúvel, o receptor ST2 atrai a IL-33 e liga-se a ela, impossibilitando a ligação desta molécula com a isoforma ligada à membrana, impedindo a sinalização (SCHMITZ et al., 2005; HAYAKAWA et al., 2007).

Foi demonstrado que a expressão da IL-33 pode ser induzida em células residentes e em células do infiltrado inflamatório (PALMER et al., 2009; PASTORELLI et al., 2010; KOBORI et al., 2010), assim como em células endoteliais de tecidos inflamados de pacientes com artrite reumatóide (LIEW et al., 2010). No entanto, na ausência de estímulos inflamatórios, a IL-33 se localiza no núcleo (BAEKKEVOLD et al., 2003; CARRIERE et al., 2007), como um fator transcricional com propriedades regulatórias (HARALDSEN et al., 2009) cuja ativação pode regular a expressão de alguns genes (CARRIERE et al., 2007). Contudo, os alvos transcricionais específicos,

os mecanismos envolvidos e sua função biológica no núcleo ainda não foram totalmente esclarecidos.

Novos estudos têm demonstrado que a secreção da IL-33 não ocorre em condições fisiológicas (LUTHI et al., 2009) e sugerem que esta citocina funciona como uma alarmina, o que explica sua origem celular ser composta predominantemente por células da primeira linha de defesa contra organismos estranhos. Deste modo, a IL-33 liberada durante a necrose celular inicia a resposta imunológica (MOUSSION et al., 2008; CAYROL e GIRARD, 2009; HARALDSEN et al., 2009; LUTHI et al., 2009). Assim como, estudos atuais demonstram que células vivas, ativadas por estímulos mecânicos também liberam a IL-33 e respondem a condições de estresse biomecânico (KAKKAR et al., 2012).

Entretanto, os estudos relacionados à ação da IL-33 na remodelação óssea ainda são conflitantes. Seu papel na osteoclastogênese tem sido abordado e sua função na remodelação óssea tem sido objeto de estudo devido à sua expressão nas células responsáveis pela formação óssea, os osteócitos e osteoblastos (SAIDI et al., 2011). SCHULZE et al. (2011) verificaram em seu estudo, o aumento da expressão da IL-33 durante a diferenciação osteoblástica, embora concentrações crescentes de IL-33 recombinante não tenham alterado a mineralização da matriz óssea. Verificou-se também que camundongos deficientes do receptor ST2, apresentam formação óssea normal e reabsorção óssea aumentada, o que resulta no fenótipo de um reduzido volume trabecular ósseo nesses animais.

Quanto a ação da IL-33 nos osteoclastos, os estudos *in vitro* publicados por MUN et al. (2010) mostram que a IL-33 estimula a osteoclastogênese induzida a partir de monócitos humanos CD14⁺, e aumenta a expressão de fatores

osteoclastogênicos como TRAF6, NFATc (Fator nuclear de células T ativadas), catepsina K e o receptor de calcitonina.

Desta forma, frente ao que foi evidenciado, o presente estudo teve como objetivo elucidar o papel da IL-33 e seu receptor na formação e progressão da lesão periapical em modelo experimental de camundongos.

Proposição

Investigar a participação da citocina IL-33 na progressão da lesão e modulação da reabsorção óssea em modelo experimental de lesão periapical.

Objetivos específicos:

- Avaliar a participação da citocina IL-33 na progressão de lesões osteolíticas utilizando o modelo de lesão periapical
- Avaliar a participação da citocina IL-33 na resposta imune durante a progressão das lesões periapicais
- Avaliar a participação da citocina IL-33 na osteogênese, osteoclastogênese e reabsorção óssea alveolar

Material e Métodos

O projeto da presente pesquisa foi submetido à apreciação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo (USP) – Campus de Ribeirão Preto (Processo nº 163/2011), tendo sido aprovado (Anexo 1).

Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c (WT), de 6-8 semanas de idade, adquiridos do Biotério Central da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto e camundongos machos *knockout* para o receptor ST2 (ST2KO), de 6-8 semanas de idade, adquiridos do Biotério de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e provenientes do The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA).

Todos os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, recebendo os cuidados de rotina. Os animais permaneceram em caixas pequenas (5 animais por caixa) forradas com maravalha autoclavada, organizadas em estantes ventiladas com sistemas independentes de insuflamento e exaustão de ar e foram alimentados com ração e água autoclavados *ad libitum*.

Modelo experimental

Protocolo de indução da lesão periapical

Para o modelo de lesão periapical, os animais foram anestesiados (via intraperitoneal) com cloridrato de Cetamina (Ketamina 10%, Agener União Química

Farmacêutica Nacional S/A. Embu-Guaçu, SP) dosagem 0,1 mL/kg de peso, e cloridrato de Xilazina (Anasedan® 2%, Ceva Santé Animale S/A. Paulínia, SP) na dosagem de 0,1 mL/Kg de peso. A seguir, os animais foram posicionados em mesa cirúrgica confeccionada especificamente para procedimentos odontológicos em camundongos, permitindo a abertura da boca para acesso e visualização dos molares inferiores.

A indução da lesão periapical foi realizada no primeiro molar inferior direito de cada animal. Para auxiliar a execução da abertura coronária, exposição pulpar e visualização da abertura dos canais radiculares foi utilizado um estereomicroscópio Zeiss Stemi 2000-C (Carl Zeiss) com iluminação ajustável através da fonte de luz fria de fibra ótica KL 1500 (Carl Zeiss).

A abertura coronária foi realizada com broca esférica de aço inoxidável 1/4 (Microdont) acoplada à caneta de baixa-rotação e contra-ângulo (Dabi Atlante Equipamentos Odontológicos, Ribeirão Preto, SP), sendo o tamanho da exposição padronizado de acordo com o diâmetro da broca. Os canais foram deixados expostos ao meio ambiente bucal (YU e STASHENKO, 1987; WEI et al., 2013). O lado esquerdo, sem exposição pulpar, constituiu o grupo controle. Os animais foram aleatoriamente submetidos à eutanásia com superdose de anestésico nos tempos de 7 ou 14 dias.

Processamento histotécnico e avaliação microscópica

Após a eutanásia dos animais, as mandíbulas foram removidas e dissecadas com instrumentais esterilizados. Foram fixadas por imersão em formol tamponado a 10% por 24 horas à temperatura ambiente. A seguir as mandíbulas foram lavadas

em água corrente por 12 horas. Para a descalcificação dos tecidos foi utilizada solução à base de EDTA a 4,13% (pH 7,4), na qual os tecidos foram mantidos submersos à temperatura ambiente, em agitador magnético. A cada 3 dias a solução de EDTA foi trocada e a descalcificação completa ocorreu após aproximadamente 30 dias. O grau de descalcificação das mandíbulas foi testado por meio da avaliação de sua consistência com a penetração de uma agulha nos tecidos.

As amostras foram então lavadas em água corrente por 30 minutos e submetidas à técnica histológica de rotina. O primeiro passo foi a desidratação, que consiste no emprego de uma ordem crescente de álcoois (80%, 90% e 95% por respectivamente 40, 45 e 50 minutos) e álcool absoluto I, II e III por uma hora cada. O próximo passo foi a diafanização e para isso as amostras foram colocadas *overnight* em uma solução de álcool e xilol (1:1). E por fim foi empregada uma solução pura de xilol por 2 horas.

Os tecidos foram imersos em parafina fundida (56 a 60°C) e mantidos em estufa por uma hora. Em seguida foram incluídos em blocos de parafina utilizando uma central de inclusão.

Cortes histológicos de 6µm foram obtidos utilizando micrótomo manual (RM2135, Leica Biosystems). Foi padronizado que as secções seriam realizadas no sentido sagital do dente, e todos os cortes incluindo a abertura do forame apical foram coletados.

Os cortes foram corados para hematoxilina e eosina (HE) ou foi realizado o ensaio para a reação de fosfatases ácidas resistentes ao tartarato TRAP, descritas separadamente abaixo:

a- A análise do tamanho da lesão foi realizada em cortes histológicos submetidos à coloração de hematoxilina e eosina, que seguiu o seguinte protocolo: as lâminas foram submetidas a banhos de xilol I, II e III (8 minutos cada), para remoção da parafina. Os cortes foram então imersos em concentrações decrescentes de álcool (100%, 95% e 80%) e lavados em água corrente. Quando hidratados, os cortes foram imersos em hematoxilina por 2 minutos, lavados com água para remoção do excesso e imersos em eosina por 40 segundos. Em seguida foram passados em álcool 90%, álcool absoluto I, II, III, solução de álcool e xilol (1:1) e xilol I, II e III.

As lâminas foram montadas com lamínulas de tamanho: 24 mm x 50 mm (Knittel Glass), coladas com um meio de montagem rápida, para microscopia (Entellan ®, Merck Millipore). As imagens foram capturadas por meio de uma câmera fotográfica digital acoplada a um microscópio de luz convencional (Leica DMI6000 B).

As lesões periapicais dos camundongos WT e ST2KO foram delineadas no Software Image J e suas áreas foram mensuradas em μm^2 . As análises dos cortes corados em hematoxilina e eosina foram realizadas em microscopia de fluorescência, utilizada como método auxiliar para determinar a região apical que sofreu reabsorção (DE ROSSI et al., 2007). A área da lesão periapical foi medida, sendo que o maior valor, correspondente à região do forame apical, foi utilizado para o cálculo da média final de cada raiz.

b- Para a detecção de osteoclastos foi realizada em um grupo de lâminas a reação de fosfatases ácidas resistentes ao tartarato (TRAP). Os cortes histológicos

foram submetidos à desparafinização e fixação por 1 minuto em solução de acetona e álcool (1:1).

As lâminas secas foram incubadas por 40 minutos a 37° C em solução do kit TRAP da Sigma (387A), ao abrigo da luz, de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida as lâminas foram contra coradas com hematoxilina por 2 minutos e passadas em soluções crescentes de álcool (80%, 95% e 100%) e xilol.

As lâminas foram montadas com lamínulas tamanho 24 mm x 50 mm (Knittel Glass, Alemanha) coladas com um meio de montagem rápida para microscopia (Entellan®, Merck Millipore). Os osteoclastos na área da lesão foram quantificados ao microscópio óptico de luz convencional.

Microtomografia computadorizada (μCT)

As hemimandíbulas destinadas à microtomografia computadorizada foram coletadas e armazenadas individualmente em solução de formol 10%. O escaneamento das amostras foi executado no Laboratório Multiusuário para Análises de Imagens Tridimensionais de Tecidos Biológicos do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

As imagens foram obtidas por um Microtomógrafo de alta resolução modelo 1172, marca SkyScan (Bélgica), composto por um tubo de raios-X de microfoco com fonte de alta tensão (100kV), um porta-amostra com manipulador de precisão e um detector baseado em uma câmera CCD de 11Mp conectados a um computador de

controle e aquisição de dados interligado em rede, a um cluster de computadores com software para reconstrução, visualização e quantificação de imagens 2D e 3D.

Após o escaneamento, as amostras foram reconstruídas utilizando o software NRecon (Skyscan, Bélgica), de modo a obter imagens bidimensionais e para a análise, foi utilizado o software CTAn (v. 1.12, Skyscan, Bélgica).

Inicialmente, a região de interesse foi selecionada, abrangendo as secções que envolvem o início e o final da raiz distal do primeiro molar inferior direito (Figura 1), o que totaliza aproximadamente uma série de 150 cortes coronais, com intervalos de aproximadamente 17 μm cada.

Figura 1. Delimitação da região de interesse a ser analisada. Nas imagens acima estão representadas na figura A, em vermelho as secções que envolvem da esquerda para a direita, o início, o meio e o fim da raiz distal analisada. Em B, C e D estão as respectivas imagens obtidas.

Em cada amostra, todas as secções da região de interesse foram analisadas. A delimitação nas amostras em que não foi induzida a lesão periapical, foi realizada na região sadia do ligamento periodontal entre osso alveolar e cimento. Nas amostras em que foi realizada a exposição pulpar, a área radiolúcida, em que houve reabsorção dos tecidos periodontais foi circunscrita e utilizada para mensuração, conforme figura abaixo (Figura 2):

Figura 2. Uma série representativa de secções coronais do primeiro molar com exposição pulpar, com um intervalo de aproximadamente 25 secções entre cada. Em vermelho, as áreas de reabsorção na região periapical que foram utilizadas no presente estudo.

As imagens obtidas a partir das amostras foram analisadas por um avaliador criterioso, rigoroso, sem conhecimento prévio do grupo que estava analisando. Para cada amostra, após a delimitação de todas as secções, o software calculou o volume ósseo (em pixels).

Coleta das amostras

Foram coletadas mandíbulas e linfonodos aos 7 e aos 14 dias após exposição pulpar. As hemimandíbulas direitas e esquerdas constituíram respectivamente, os grupos em que a lesão foi induzida e os grupos controles. Os linfonodos direitos e esquerdos constituíram respectivamente os grupos ipsilaterais à hemimandíbula em que foi realizada a indução da lesão periapical e os grupos ipsilaterais à hemimandíbula controle.

Após a coleta das hemimandíbulas, a gengiva e a mucosa bucal foram cuidadosamente descartadas, bem como o tecido ósseo à mesial do primeiro molar e à distal do terceiro molar de cada amostra. O material de interesse, o qual compreendeu a porção coronária e apical do primeiro, segundo e terceiro molar, foi armazenado em tubos previamente autoclavados e estes foram mantidos a -70°C até o momento da avaliação por Real time PCR ou MPO.

Real time PCR

O isolamento de RNA total das amostras foi realizado utilizando o kit SV Total RNA Isolation System (Promega Biotecnologia) seguindo o protocolo do fabricante. A

quantificação do RNA foi realizada por meio de nanofotometria (NanoPhotometer® P360, Implen, Inc., Califórnia, EUA).

A síntese do cDNA, por meio de reação de transcriptase reversa (kit cDNA Improm II Promega), foi realizada utilizando 1 micrograma (μg) de RNA total, seguindo instruções do fabricante.

A reação de PCR para amplificação dos genes de interesse foi realizada utilizando o TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) e o termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). *Primers* e sondas para IL-33 (Mm00505403), ST2 (Mm00516117), RANK (Mm00437132), RANKL (Mm00441906), OPG (Mm01205928), catepsina K (Mm00484039), MMP-9 (Mm00442991), Runx2 (Mm00501584), osteocalcina (Mm00649782), fosfatase alcalina (Mm00437457), colágeno tipo I (Mm00801666), T-bet (Mm00450960), GATA-3 (Mm00484683), RORc (Mm01261022) e Foxp-3 (Mm00475162) foram obtidos do fornecedor (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems) e as sequências são propriedades privadas. O gene gapdh (Mm99999915) foi utilizado como gene endógeno.

A análise foi baseada no resultado do ciclo limiar (C_t - *cicle threshold*), cujo valor corresponde ao ciclo no qual a amplificação das amostras atingiu o grau de fluorescência com amplificação exponencial, que permite a análise quantitativa da expressão do gene alvo.

Os dados de cada amostra foram normalizados pela expressão do gene de referência gapdh e as análises para cada *primer* através da quantificação relativa ao grupo WT controle ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Ensaio de mieloperoxidases (MPO)

As amostras foram maceradas com homogenizador (Politron) em presença de tampão de lise (100ul de tampão a cada 10mg de tecido) contendo inibidores de proteases Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche).

Para este ensaio, o pellet obtido a partir da centrifugação foi utilizado. Este foi ressuspenso em 500ul da solução tampão 1, e em seguida foi homogenizado em um agitador de tubos. O tubo contendo as amostras foi congelado e descongelado à temperatura ambiente, por 3 vezes. Em seguida foi centrifugado a 15.000 rpm por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante resultante foi utilizado para análise da atividade de MPO.

Em uma placa de 96 poços a curva padrão foi previamente elaborada, para permitir que, a partir desta, fosse feita a correlação da absorbância com o número de neutrófilos. A absorbância foi medida a 450nm em espectrofotômetro (Spectra Max-250, Molecular Devices). Os resultados foram apresentados em número de neutrófilos/mg de tecido.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação do tamanho das lesões periapicais, a análise do número de osteoclastos e mediadores inflamatórios e osteoclastogênicos identificados em cada período experimental foram submetidas a testes estatísticos One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Os dados foram analisados por meio do programa estatístico Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software Inc, San Diego, CA, EUA) com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Participação da citocina IL-33 na progressão de lesões periapicais

Determinação da expressão gênica de IL-33 e ST2

Com o objetivo de avaliar a expressão de IL-33 e ST2 nos animais WT em função do tempo, foram coletadas amostras nos tempos 7, 10 e 14 dias, para análise por PCR em tempo real.

A expressão de IL-33 nos animais WT aos 7, 10 e 14 dias foi semelhante nos grupos controle ($p > 0,05$). A expressão foi maior no grupo lesão aos 14 dias quando comparada aos grupos lesão aos 7 e 10 dias ($p < 0,05$) e quando comparada a seu respectivo controle ($p < 0,05$).

Figura 3. Representação gráfica da expressão de IL-33 (% de GAPDH) avaliada na região periapical de dentes controles e com lesão periapical, de camundongos WT, nos períodos experimentais de 7, 10 e 14 dias. * $p < 0,05$, em relação a seu respectivo controle. # $p < 0,05$, em relação a lesão aos 7 e 10 dias. (n=5 a 6).

Foi realizado um estudo da expressão dos receptores ST2 nos animais WT nos períodos experimentais de 7, 10 e 14 dias. Ao comparar a expressão do receptor ST2 nos grupos controle, observamos que não houve diferenças entre estes ($p > 0,05$). A expressão deste receptor aumenta em função do tempo de lesão e foi possível observar diferença estatisticamente significativa aos 14 dias de lesão em relação a 7 e 10 dias ($p < 0,05$).

Figura 4. Representação gráfica da expressão de ST2 (% de GAPDH) avaliada na região periapical de dentes controles e com lesão periapical, de camundongos WT, nos períodos experimentais de 7, 10 e 14 dias. * $p < 0,05$, em relação a seu respectivo controle. # $p < 0,05$, em relação a lesão aos 7 e 10 dias. (n=5 a 6).

Também foi realizada a análise da expressão gênica de ST2 nos camundongos ST2KO e comparados aos WT. Obtivemos os resultados esperados, de não haver expressão (ND) nos camundongos ST2KO.

Figura 5. Representação gráfica da expressão de ST2 (% de GAPDH) avaliada na região periapical de dentes controles e com lesão periapical, de camundongos WT e ST2KO, no período experimental de 7 dias. * $p < 0,05$, em relação ST2KO controle e lesão. (n=5 a 6).

Análise descritiva dos tecidos periapicais e pulpares

A análise descritiva dos tecidos periapicais e pulpares foi realizada em cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina, sob microscopia de luz convencional. Primeiramente foram analisados os grupos controle dos animais WT e ST2KO (Figura 6). Observou-se a presença de tecido pulpar sadio, superfície cementária regular, ligamento periodontal com fibras e células organizadas, ausência de infiltrado inflamatório e osso alveolar íntegro.

As alterações histológicas dos tecidos dentários (polpa, cimento) e ligamento periodontal nos grupos submetidos a exposição pulpar, foram semelhantes ao comparar animais WT e ST2KO nos mesmos períodos experimentais (Figura 6).

Aos 7 dias, observou-se necrose parcial do tecido pulpar, atingindo até o terço médio da raiz; superfície cementária regular, com ausência de reabsorções; ligamento periodontal moderadamente aumentado, com fibras e células desorganizadas.

E aos 14 dias, foi observada a necrose total do tecido pulpar; superfície cementária com irregularidades e ligamento periodontal severamente aumentado, com fibras e células desorganizadas. As análises histológicas indicam um processo mais intenso e destrutivo aos 14 dias quando comparado aos 7 dias.

No entanto, foi possível observar características diferentes relacionadas ao infiltrado inflamatório na região periapical e ao padrão de reabsorção do osso alveolar. De maneira que, aos 7 e aos 14 dias foi notado um infiltrado inflamatório mais denso, ocupando uma maior extensão nos animais WT do que nos animais ST2KO, bem como superfícies de reabsorção óssea mais irregulares do que as observadas nos animais ST2KO.

Portanto, de modo sucinto, a lesão periapical apresenta características mais severas aos 14 dias, quando comparadas às dos 7 dias, tanto nos animais WT, quanto nos ST2KO. A lesão periapical dos animais ST2KO difere das lesões dos animais WT, apresentando infiltrado inflamatório menos intenso e presença de fibras espessas e desorganizadas, com as áreas de reabsorção do osso alveolar mais regulares. Tais análises podem ser observadas nas fotomicrografias representativas dispostas abaixo (Figura 6).

Figura 6. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos da raiz distal de primeiros molares inferiores em que foi induzida a lesão periapical e controle, dos grupos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. Cortes corados com hematoxilina e eosina observados em microscopia convencional e fluorescente, nos quais foram avaliadas as características dos tecidos pulpares e periapicais e mensuradas as lesões periapicais. (aumento 10x).

Morfometria em microscopia de fluorescência

A mensuração das áreas das lesões foi realizada nas lâminas coradas em hematoxilina e eosina utilizando a microscopia de fluorescência, visto que dados publicados por DE ROSSI et al. (2007) demonstraram que a visualização e determinação da área da lesão é favorecida por esta técnica (Figura 6).

A área da lesão compreende o espaço entre o ápice do dente e o osso alveolar, estendendo-se até o limite da região de desorganização do ligamento periodontal (área contornada na Figura 6). Nas amostras controles a região que compreende o ligamento periodontal sadio foi mensurada como área do controle. Aos 7 e 14 dias evidenciou-se maiores áreas nos grupos em que foi induzida a lesão periapical quando comparadas com as áreas dos grupos controles ($p < 0,05$). Nos animais ST2KO, avaliados aos 7 dias, a área da lesão foi maior que o controle embora este aumento não seja estatisticamente significativo ($p > 0,05$).

No grupo de animais WT, evidenciou-se que a área da lesão periapical é maior aos 14 dias, quando comparada aos 7 dias ($p < 0,05$). No grupo de animais ST2KO, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as áreas mensuradas aos 7 e aos 14 dias, embora possa ser observada uma tendência a ser maior aos 14 dias (Figura 7).

Comparando os grupos em que foi induzida a lesão periapical nos animais WT e ST2KO observou-se que aos 14 dias os animais WT apresentaram lesões periapicais maiores que as induzidas nos animais ST2KO ($p < 0,05$) (Figura 7).

Figura 7. Representação gráfica da área (μm^2) da lesão periapical de camundongos WT e ST2KO nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. * $p < 0,05$, em relação a seu respectivo controle. # $p < 0,05$, em relação a WT lesão aos 7 dias. + $p < 0,05$, em relação a WT lesão aos 14 dias. Experimento reproduzido 3 vezes ($n=5$ a 6).

Análise do volume da lesão periapical por microtomografia computadorizada (μCT)

De modo a complementar e confirmar os resultados obtidos pela análise morfométrica da lesão periapical, foi realizada a mensuração do volume das lesões periapicais (em pixels).

Os resultados obtidos estão representados em imagens bidimensionais (Figuras 8 e 9), em imagens reconstruídas (Figuras 10 e 11) e em representação gráfica (Figura 12).

Figura 8. Imagens representativas bidimensionais obtidas através do escaneamento da mandíbula de camundongos WT e ST2KO em microtomógrafo computadorizado, no período experimental de 7 dias. Secções centrais da raiz distal de primeiros molares inferiores, seleccionadas para representar a porção de lesão periapical com maior extensão (em vermelho).

Figura 9. Imagens representativas bidimensionais obtidas através do escaneamento da mandíbula de camundongos WT e ST2KO em microtomógrafo computadorizado, no período experimental de 14 dias. Secções centrais da raiz distal de primeiros molares inferiores, seleccionadas para representar a porção de lesão periapical com maior extensão (em vermelho).

Figura 10. Imagens representativas tridimensionais reconstruídas após escaneamento da mandíbula de camundongos WT e ST2KO em microtomógrafo computadorizado, no período experimental de 7 dias. Abertura central da raiz distal de primeiros molares inferiores, selecionada para possibilitar a comparação do volume das lesões periapicais com os controles.

Figura 11. Imagens representativas tridimensionais reconstruídas após escaneamento da mandíbula de camundongos WT e ST2KO em microtomógrafo computadorizado, no período experimental de 14 dias. Abertura central da raiz distal de primeiros molares inferiores, selecionada para possibilitar a comparação do volume das lesões periapicais com os controles.

Ao comparar os grupos em que foi induzida a lesão periapical com os grupos controle, foi possível observar que nos animais WT, os grupos com lesão periapical apresentam maiores volumes ($p<0,05$). O volume observado nos animais ST2KO em que foram induzidas as lesões periapicais não apresenta diferença estatisticamente significativa com os respectivos grupos controles ($p>0,05$).

No grupo de animais WT, ao comparar o volume das lesões aos 7 e 14 dias, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$), embora haja uma tendência à ser maior aos 14 dias. A análise do volume de lesão em animais ST2KO mostrou que entre o período de 7 e 14 dias não houve evolução da lesão, ou seja, o tamanho da lesão nos animais ST2KO foi semelhante ($p>0,05$).

Aos 14 dias os animais WT apresentaram lesões periapicais maiores quando comparadas com as lesões observadas nos animais ST2KO ($p<0,05$).

Figura 12. Representação gráfica do volume de reabsorção óssea (pixels) da lesão periapical de camundongos WT e ST2KO nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. * $p<0,05$, em relação a seu respectivo controle. # $p<0,05$, em relação a WT lesão aos 14 dias. Experimento reproduzido 2 vezes ($n=3$).

Avaliação da participação da citocina IL-33 na resposta imune durante o desenvolvimento e progressão das lesões periapicais

Determinação do número de neutrófilos nas regiões periapicais através do Ensaio de Mieloperoxidases (MPO)

A avaliação do número de neutrófilos que migraram para a região periapical após a indução do modelo experimental foi realizada por meio do ensaio de mieloperoxidases (MPO).

Nos grupos controles, o número de neutrófilos foi semelhante ao encontrado nos respectivos grupos em que foi induzida a lesão periapical ($p > 0,05$), com tendência a ser maior nos grupos em que foi induzida a lesão. Em animais WT, evidenciou-se que aos 7 dias, a presença de neutrófilos foi maior quando comparada à das lesões aos 14 dias ($p < 0,05$). No grupo de animais ST2KO, observou-se que a presença de neutrófilos nas lesões periapicais aos 7 dias foi semelhante à das lesões periapicais aos 14 dias ($p > 0,05$).

Aos 7 dias foi observado maior número de neutrófilos na lesão periapical dos animais WT quando comparada com a dos animais ST2KO ($p < 0,05$). Aos 14 dias, o número de neutrófilos nas lesões periapicais dos animais WT foi semelhante ao dos animais ST2KO ($p > 0,05$) (Figura 13).

Figura 13. Representação gráfica do número de neutrófilos (neutrófilos/mg de tecido), avaliados na região periapical de dentes controles e com lesão periapical, de camundongos WT e ST2KO nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. * $p < 0,05$, em relação a WT lesão aos 7 dias. # $p < 0,05$, em relação a WT lesão aos 14 dias. Experimento reproduzido 2 vezes ($n = 5$ a 6).

Avaliação da expressão gênica dos fatores de transcrição nos linfonodos

Com o objetivo de determinar se os linfonodos submandibulares, ipsilaterais ao lado com lesão e ao lado controle, apresentariam um padrão de resposta imune diferentes, foi avaliada a expressão de *T-bet*, *RORc*, *GATA-3* e *Foxp-3* por PCR em tempo real.

T-bet é um fator de transcrição que caracteriza células de padrão Th1 (SZABO et al., 2000). Embora aos 7 dias tenha sido observada uma tendência de maior expressão deste fator transcricional nos linfonodos ipsilaterais à lesão periapical nos animais WT, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Da mesma forma, observamos que a expressão de T-bet foi semelhante ao avaliarmos lados controles e com lesão nos animais WT aos 14 dias de lesão.

A expressão de T-bet entre lado controle e com lesão não foi diferente nos animais ST2KO avaliados, tanto aos 7 quanto 14 dias de lesão ($p>0,05$) (Figura 14).

Figura 14. Representação gráfica da expressão de T-bet (% de GAPDH) avaliado nos linfonodos ipsilaterais à hemimandíbula em que foi induzida a lesão periapical e à hemimandíbula controle de camundongos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. (n=10 a 12).

A análise da expressão de GATA-3, um fator transcricional que induz o padrão de resposta Th2 e inibe a Th1 (ZHENG e FLAVELL, 1997; NAWIJN et al., 2001), permitiu observar que não existem diferenças estatisticamente significantes entre os linfonodos coletados no lado controle e com lesão ($p>0,05$). A expressão deste fator de transcrição foi semelhante tanto nos animais WT quanto nos animais ST2KO ($p>0,05$) (Figura 15).

Figura 15. Representação gráfica da expressão de GATA-3 (% de GAPDH) avaliada nos linfonodos ipsilaterais à hemimandíbula em que foi induzida a lesão periapical e ao controle de camundongos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias (n=10 a 12).

RORc é um gene transcricional que caracteriza células Th17 (WEI et al., 2013). Aos 7 dias não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos avaliados ($p < 0,05$). Nos animais WT, aos 14 dias de lesão, observou-se uma tendência a maior expressão de RORc nos linfonodos ipsilaterais à lesão quando comparados ao lado controle, porém sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

A expressão de RORc entre lado controle e com lesão não foi diferente nos animais ST2KO avaliados aos 7 e 14 dias de lesão ($p > 0,05$) (Figura 16).

Figura 16. Representação gráfica da expressão de RORc (% de GAPDH) nos linfonodos ipsilaterais à hemimandíbula em que foi induzida a lesão periapical e ao controle de camundongos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. (n=10 a 12).

Foxp-3 é um fator transcricional e um marcador de células T regulatórias (FONTENOT e RUDENSKY, 2005). Aos 7 dias de lesão não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$). Embora haja a tendência de nos animais WT o grupo de linfonodos ipsilaterais à lesão apresentar menor expressão quando comparado ao grupo controle ($p>0,05$).

Aos 14 dias também não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$). No entanto, foi observada a tendência de os grupos de linfonodos ipsilaterais à lesão, nos animais ST2KO, apresentarem maior expressão quando comparados aos grupos controles ($p>0,05$) (Figura 17).

Figura 17. Representação gráfica da expressão de Foxp-3 (% de GAPDH) avaliado nos linfonodos ipsilaterais à hemimandíbula em que foi induzida a lesão periapical e à hemimandíbula controle de camundongos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias (n=10 a 12).

Avaliação da participação da citocina IL-33 na osteogênese

Determinação da expressão gênica por marcadores osteoblásticos Runx2, osteocalcina, colágeno tipo I e fosfatase alcalina nos tecidos periapicais

Considerando que a integridade do tecido ósseo depende da manutenção de um delicado equilíbrio entre formação óssea pelos osteoblastos e a reabsorção óssea pelos osteoclastos, foi avaliada a expressão gênica de marcadores da diferenciação osteogênica neste cenário de infecção.

A análise da expressão de Runx2, um gene envolvido na diferenciação osteoblástica, cuja atividade pode controlar outros genes relacionados com a formação de tecido ósseo (SHUI et al., 2003), permitiu observar maior expressão de Runx2 no grupo lesão dos animais ST2KO aos 14 dias, quando comparados a seu respectivo controle ($p < 0,05$). Nos outros grupos, os valores de expressão foram semelhantes (Figura 18).

Figura 18. Representação gráfica da expressão de Runx2 (% de GAPDH) avaliado na região periapical de dentes controles e com lesão periapical, de camundongos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. * $p < 0,05$, em relação a seu respectivo controle (n=10 a 12).

Ao avaliar a expressão de osteocalcina secretada por osteoblastos (LEE et al., 2007) e depositada na matriz óssea, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos lesão e controle aos 7 e 14 dias ($p>0,05$).

Aos 7 dias, a expressão de osteocalcina na lesão dos animais WT e ST2KO foi semelhante ($p>0,05$), embora haja tendência a ser maior nos WT. Aos 14 dias não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$) (Figura 19).

A expressão de colágeno tipo I, um dos principais componentes da matriz extracelular, responsável por reforçar a estrutura óssea (LODISH et al., 2000), não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos lesão e controle ($p>0,05$). Embora haja a tendência de ser menor nos grupos controles, exceto nos animais ST2KO aos 14 dias.

Aos 7 dias, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos lesão dos animais WT e ST2KO ($p>0,05$). Aos 14 dias, comparando os grupos em que foi induzida a lesão periapical, não foram observadas diferenças ($p>0,05$), porém há uma propensão a ser maior nos animais WT (Figura 19).

Figura 19. Representação gráfica da expressão de Osteocalcina e Colágeno I (% de GAPDH) avaliadas na região periapical de dentes controles e com lesão periapical, de camundongos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. (n=10 a 12).

A fosfatase alcalina é sintetizada por osteoblastos e está envolvida na calcificação da matriz óssea (MASROUR ROUDSARI e MAHJOUB, 2012). Os resultados referentes à sua expressão não permitiram observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos lesão e controle ($p > 0,05$), embora haja uma tendência a maior expressão nos grupos lesão quando comparados aos grupos controles, exceto nos animais ST2KO, em que a tendência é de haver maior expressão no grupo controle.

Aos 7 dias a expressão de fosfatase alcalina foi semelhante nos grupos lesão dos animais WT e ST2KO ($p > 0,05$). Aos 14 dias também não foram observadas

diferenças na expressão de fosfatase alcalina ($p>0,05$), embora haja a propensão a ser maior nos animais WT em relação aos ST2KO (Figura 20).

Figura 20. Representação gráfica da expressão de Fosfatase alcalina (% de GAPDH) avaliada na região periapical de dentes controles e com lesão periapical, de camundongos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. (n=10 a 12).

Avaliação da participação da citocina IL-33 na osteoclastogênese e reabsorção óssea

Determinação da expressão gênica dos marcadores osteoclásticos RANK, RANKL e OPG nos tecidos periapicais

RANK é o receptor de RANKL, envolvido no processo de diferenciação osteoclástica (BOYCE et al., 2007). Ao comparar os grupos controle e lesão foi observada maior expressão no grupo lesão dos animais WT aos 7 e 14 dias ($p<0,05$), enquanto foi observada apenas uma tendência de maior expressão nos grupos com lesão em relação aos controles nos animais ST2KO. Ao comparar os

grupos lesão aos 7 dias, a expressão de RANK foi semelhante nos animais WT e ST2KO ($p>0,05$) (Figura 21).

Figura 21. Representação gráfica da expressão de RANK (% de GAPDH) avaliada na região periapical de dentes controles e com lesão periapical, de camundongos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. * $p<0,05$, em relação a seu respectivo controle ($n=10$ a 12).

RANKL é o ligante do receptor RANK e também está envolvido com o processo de osteoclastogênese (BOYCE et al., 2007). Nos animais WT aos 7 dias foi observada maior expressão no grupo lesão, que no grupo controle ($p<0,05$), enquanto nos outros grupos foi possível observar apenas a tendência de maior expressão nos grupos lesão. Aos 7 dias a expressão de RANKL nos grupos em que foi induzida a lesão foi semelhante ao analisar animais WT e ST2KO ($p>0,05$), embora possa ser observada a propensão de maior expressão nos animais ST2KO. Aos 14 dias, nos grupos em que foi induzida a lesão, não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

A osteoprotegerina apresenta um papel protetor, prevenindo a diferenciação de osteoclastos, ao se ligar a RANKL e impedindo a ligação de RANKL com RANK (BOYCE et al., 2007). Nos animais WT aos 14 dias a expressão de OPG foi maior no

grupo lesão, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$), enquanto nos outros grupos foi observada a tendência de ser maior nos grupos lesão.

Aos 7 dias a expressão de OPG foi semelhante nos grupos em que foi induzida a lesão periapical, sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Aos 14 dias, nos grupos em que foi induzida a lesão periapical, a expressão também foi semelhante ($p > 0,05$) (Figura 22).

Figura 22. Representação gráfica da expressão de RANKL e OPG (% de GAPDH) avaliados na região periapical de dentes controles e com lesão periapical, de camundongos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. * $p < 0,05$ em relação a seu respectivo controle ($n=10$ a 12).

RANKL/OPG

A razão RANKL/OPG é diretamente proporcional aos eventos que levam à diferenciação osteoclástica. Ao analisar os resultados pudemos observar maior razão nos animais ST2KO aos 7 dias, quando comparado ao seu respectivo controle ($p < 0,05$) (Figura 23).

Figura 23. Representação gráfica da razão da expressão de RANKL/OPG (% de GAPDH) avaliada na região periapical de dentes controles e com lesão periapical, de camundongos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. * $p < 0,05$ em relação a seu respectivo controle ($n=8$ a 12).

Determinação do número de osteoclastos na região periapical por meio de histoenzimologia para a atividade da fosfatase ácida resistente ao tartarato

A detecção de osteoclastos foi realizada em um grupo de lâminas pela reação de fosfatases ácidas resistentes ao tartarato (TRAP), as células coradas positivamente foram contadas (Figura 24).

Figura 24. Fotomicrografias de cortes histológicos da raiz distal de primeiros molares inferiores em que foi induzida a lesão periapical, representativos dos grupos WT e ST2KO, no período experimental de 14 dias. Cortes ensaiados para TRAP observados em microscopia convencional, nos quais foram contados os número de osteoclastos. As imagens em B e D representam as imagens indicadas nos quadrados em A e C, respectivamente, em aumento 20x.

Observou-se maior número de células multinucleadas TRAP positivas na região periapical das lesões quando comparados com os grupos controles. Este efeito foi observado nos grupos de animais WT avaliados aos 14 dias de lesão e animais ST2KO avaliados aos 7 e 14 dias de lesão ($p < 0,05$). Nos animais WT, aos 7 dias de lesão não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo lesão e controle ($p > 0,05$) (Figura 25).

Comparando os grupos em que foi induzida a lesão periapical no período experimental de 7 dias, observou-se maior número de osteoclastos na lesão periapical dos animais ST2KO do que dos WT ($p < 0,05$). Aos 14 dias, nos grupos em que foi induzida a lesão periapical, foi possível observar que os animais ST2KO apresentaram um número maior de osteoclastos do que os animais WT ($P < 0,05$).

Figura 25. Representação gráfica do número de osteoclastos detectados na reação de TRAP, presentes na lesão periapical de camundongos WT e ST2KO nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. * $p < 0,05$, em relação a seu respectivo controle. # $p < 0,05$, em relação à WT lesão aos 7 dias. + $p < 0,05$, em relação à WT lesão aos 14 dias. Experimento reproduzido 3 vezes ($n=5$ a 6).

Determinação da expressão gênica dos marcadores da atividade dos osteoclastos catepsina K, MMP-9 nos tecidos periapicais

A Catepsina K, responsável pela degradação da matriz óssea (GELB et al., 1996) é expressa abundantemente em osteoclastos ativos (YAMAZA et al., 1998). Observou-se maior expressão de catepsina K nos grupos com lesão dos animais WT quando comparados aos grupos controle ($p < 0,05$). A maior expressão desta enzima foi observada tanto aos 7 quanto 14 dias de lesão (Figura 26).

Por outro lado, os grupos controle e lesão dos animais ST2KO não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$), embora tenha sido observada a tendência de ser maior nos grupos lesão. Aos 14 dias, comparando os grupos em que foi induzida a lesão, foi observada maior expressão de catepsina K nos animais WT do que nos ST2KO ($p < 0,05$).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são enzimas que iniciam o processo de reabsorção osteoclástica, degradando o colágeno da superfície óssea (DELAISSÉ et al., 2000; CARNEIRO et al., 2000; COROTTI et al., 2009).

Observou-se que a expressão de MMP-9 foi significativamente maior nos sítios de lesão periapical, quando comparada com os sítios de animais controle dos animais WT aos 7 e aos 14 dias ($p < 0,05$), enquanto que, nos animais ST2KO não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos lesão e controle ($p > 0,05$).

Aos 7 dias, ao comparar os animais em que foi induzida a lesão periapical, é possível observar a semelhança entre a expressão de MMP-9 nos animais WT e

ST2KO ($p>0,05$). Aos 14 dias, há uma maior expressão de MMP-9 na lesão dos animais WT do que na lesão dos ST2KO ($p<0,05$) (Figura 26).

Figura 26. Representação gráfica da expressão de Catepsina K e MMP-9 (% de GAPDH), avaliada na região periapical de dentes controles e com lesão periapical, de camundongos WT e ST2KO, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias. * $p<0,05$, em relação a seus respectivos controles, # $p<0,05$, em relação à WT lesão aos 14 dias ($n=14$ a 18).

Discussão

Copiosos estudos vêm sendo realizados com a finalidade de desvendar as lacunas remanescentes no conhecimento do papel fisiopatológico da IL-33. Membro da família da interleucina-1, esta citocina é capaz de regular uma complexa rede celular. Sua atividade usual é estabelecida por meio da ligação com o receptor ST2, porém existe também o papel exercido como fator nuclear intracelular, com propriedades transcricionais regulatórias (HARALDSEN et al., 2009).

Neste contexto, é importante relatar que a maioria das pesquisas vinculadas à função da IL-33 na osteoimunologia demonstram apenas sua função no eixo IL-33/ST2. Porém, a análise de seu papel como fator nuclear, ainda pode desvendar muitas atribuições desta citocina na regulação da homeostase óssea (DA LUZ et al., 2014).

Os estudos realizados até hoje propõem que a IL-33 apresenta um importante papel no reconhecimento de estímulos que induzem às injúrias teciduais promovidas por inúmeras doenças infecciosas e inflamatórias (LIEW et al., 2010). E, por apresentar a habilidade de ativar células do sistema imune inato e adaptativo (LIEW et al., 2010), o eixo IL-33/ST2 parece estar envolvido na atividade destas células e induzindo o início, perpetuação ou ainda participando da resolução de inúmeras doenças.

Neste sentido, o papel protetor do eixo IL-33/ST2 foi relatado em diversas doenças, como na aterosclerose, obesidade, remodelação cardíaca após infarto agudo do miocárdio (MILLER e LIEW, 2011), assim como na sepse. Nesta última, foi mostrado que animais tratados com IL-33 apresentaram uma doença mais branda,

por induzir um maior infiltrado de neutrófilos no local da infecção (ALVES-FILHO et al., 2010).

Por outro lado, estudos também revelam o papel do eixo IL-33/ST2 no desenvolvimento de inúmeras doenças. Foi demonstrado o papel da IL-33 na artrite reumatóide, atuando por meio de diferentes vias (VERRI et al., 2010). Estudos desenvolvidos por PUSHPARAJ et al. (2009) relataram que na presença de imunoglobulina E (IgE) a IL-33 promove o choque anafilático e outros estudos indicam que a IL-33 participa aumentando a severidade da asma experimental (KUROWSKA-STOLARSKA et al., 2009).

Contudo, o papel do eixo IL-33/ST2 no desenvolvimento e progressão da lesão periapical induzida experimentalmente ainda não foi desvendado. A fim de caracterizá-lo, no presente estudo camundongos WT e deficientes para o receptor ST2 foram submetidos ao modelo de indução da lesão periapical.

A indução da lesão periapical experimental foi realizada em camundongos de acordo com o modelo clássico utilizado por YU e STASHENKO (1987), no qual a câmara pulpar é exposta e a contaminação ocorre pelos microrganismos da cavidade bucal. A lesão periapical induzida por este modelo apresenta características semelhantes às observadas no modelo de lesão periapical por exposição pulpar seguida pela inoculação polimicrobiana.

Neste estudo foi empregada a avaliação histomorfométrica da lesão periapical por microscopia de fluorescência proposta por DE ROSSI et al. (2007), a qual é utilizada como método complementar da avaliação por microscopia convencional. Esta metodologia, além de simples, permite aprimorar a visualização

das estruturas anatômicas do dente e de modo especial o ligamento periodontal, favorecendo o delineamento preciso da reabsorção óssea.

Inicialmente, frente aos resultados prévios publicados por SCHULZE et al. (2011), que mostraram que vértebras e tíbias de camundongos ST2KO apresentam um fenótipo esquelético com menor trabeculado ósseo. No presente estudo, foi realizada a avaliação histomorfométrica do tecido ósseo da região periapical e demonstrou-se que não existem diferenças, ou seja, a área que compreende o ligamento periapical de animais WT e ST2KO são semelhantes, o que não compromete o estudo de avaliação do tamanho da lesão entre as duas linhagens.

A análise histomorfométrica mostrou que animais WT apresentam desenvolvimento da lesão e reabsorção óssea em função do tempo, ou seja, a lesão periapical é maior aos 14 dias que o observado aos 7 dias. Por outro lado, foi observado que a lesão periapical em animais ST2KO não progride em função do tempo, visto que, o tamanho das lesões aos 7 e 14 dias são semelhantes. Foi possível observar maior área das lesões periapicais nos animais WT aos 14 dias, quando comparada à dos animais ST2KO ($p < 0,05$).

Com o objetivo de complementar e confirmar os resultados obtidos através das análises histológicas foi realizado o estudo empregando a μ CT, que possibilitou a avaliação tridimensional da área de lesão periapical. Assim, por meio da μ CT os volumes das lesões periapicais foram analisados e os resultados obtidos apresentaram-se equivalentes aos obtidos na avaliação da área de lesão por histologia. Foi observado que as lesões periapicais dos animais WT apresentaram maior reabsorção que os ST2KO, tanto no período de 7 dias quanto ao 14 dias. Semelhantemente ao observado na histologia, os animais ST2KO apresentaram o

volume das lesões periapicais constante dos 7 aos 14 dias ($p>0,05$) e o volume da lesão dos animais WT mostrou uma tendência ao aumento progressivo em função do tempo.

Com base nos resultados obtidos por histomorfometria e μ CT, observou-se que, na ausência do receptor ST2 ocorre uma alteração no curso da lesão periapical, tornando esta mais branda, principalmente aos 14 dias. Esses dados sugerem que o receptor ST2 não participa do início da lesão periapical, mas é importante em seu processo de cronificação e desenvolvimento.

A lesão periapical é um processo imunoinflamatório, em que a atividade de diversas células envolvidas, como neutrófilos, linfócitos B, linfócitos T, macrófagos, mastócitos, dentre outras, é responsável por mediar tanto o fenômeno imune quanto inflamatório (STASHENKO et al., 1992). A resposta imune inata representa a proteção inicial do hospedeiro. Os neutrófilos fazem parte desta resposta e compreendem o primeiro tipo celular a responder à maioria das infecções. Embora as análises não tenham sido realizadas em fases anteriores aos 7 dias, em que os neutrófilos possivelmente estariam em maior número e atividade, vale destacar que aos 7 dias os camundongos WT apresentaram maior número de neutrófilos na região periapical, do que o observado em animais ST2KO ($p<0,05$). Esses dados sugerem que a presença da via IL-33/ST2 torna mais intensa a resposta mediada por neutrófilos. Estes resultados estão de acordo com o encontrado no estudo de ALVES-FILHO et al. (2010), que demonstrou que a IL-33 promoveu a ativação de neutrófilos na sepse induzida. Os autores observaram ainda que o aumento de neutrófilos ocasionou a prevenção da doença, enquanto no presente estudo o maior número de neutrófilos foi encontrado em animais WT que apresentaram maior lesão.

Estudos sugerem que a resposta imune gerada frente aos desafios antigênicos na lesão periapical é coordenada principalmente pela atividade dos linfonodos (TAKAHASHI et al., 1999) próximos à região (TASMAN et al., 2000). Desta forma, foram avaliados os linfonodos submandibulares responsáveis por drenar a região da lesão.

Por conseguinte, buscando caracterizar a resposta imune adaptativa envolvida na progressão da inflamação gerada na lesão periapical dos camundongos, avaliamos os fatores de transcrição responsáveis pelo equilíbrio entre o desenvolvimento de respostas padrão Th1, Th2, Treg e Th17 (SZABO et al., 2000), que são respectivamente T-bet (SZABO et al., 2000), GATA-3 (ZHENG e FLAVELL, 1997; NAWIJN et al., 2001), Foxp-3 (FONTENOT e RUDENSKY, 2005) e RORc (WEI et al., 2013).

Entretanto, o padrão associado à imunomodulação de lesões periapicais ainda não apresenta um consenso na literatura. Estudos indicam que as respostas Th1 e Th2 ocorrem simultaneamente na lesão periapical (SILVA et al., 2005). Estudos realizados por KAWASHIMA e STASHENKO (1999) sugerem que a resposta imune Th1, mediada por citocinas pró-inflamatórias, está relacionada com a progressão de lesões e reabsorção óssea. Enquanto o estudo de SASAKI et al. (2000) sugere que as citocinas Th2 podem induzir ou suprimir a regulação das inflamações ósseas *in vivo*.

Os padrões de resposta Th1 e Th2 podem ser regulados pelas células T regulatórias (Treg) (SAKAGUCHI, 2004), que atuam suprimindo o sistema imune por meio de inúmeros mecanismos moleculares (CHEN et al., 2011). E também podem ser regulados pelas células T helper 17 (Th17), que agem de maneira oposta às

células Treg, induzindo a resposta inflamatória por meio da secreção de citocinas inflamatórias (CHEN et al., 2011).

Por outro lado, dados da literatura revelam que a IL-33 parece ser dispensável para o desenvolvimento de uma resposta imune adquirida mediada por células T dependentes (OBOKI et al., 2010). O estudo de COLIC et al. (2009), mostra ainda que o padrão Th1 é igualmente importante em todos os estágios do desenvolvimento da lesão. KAWASHIMA e STASHENKO (1999) sugeriram que a expressão de citocinas Th1 e Th2 aumentou de modo semelhante em resposta à inflamação pulpar.

Os resultados obtidos em nosso estudo mostraram que não foram detectadas diferenças na expressão dos fatores de transcrição T-bet, GATA-3, Foxp-3 e RORc entre os grupos controle e lesão. Embora o padrão associado à imunomodulação de lesões periapicais ainda seja controverso, nossos dados sugerem a possibilidade de que a avaliação da resposta imune seja limitada, por ser realizada em linfonodos no lado controle e no lado em que foi induzida a lesão de um mesmo animal.

A expressão dos fatores de transcrição foi semelhante, tanto em animais WT quanto em ST2KO ($p > 0,05$). A avaliação da expressão dos diferentes fatores de transcrição não nos permitiu delinear um padrão de resposta imune envolvido no modelo experimental que caracterize a resposta distinta entre animais WT e ST2KO. Neste sentido, não podemos descartar a participação do eixo IL-33/ST2 na imunomodulação das lesões periapicais.

Foi observado um aumento progressivo do número de receptores ST2 com a progressão da lesão. Resultado este que está de acordo com o observado no estudo

de Hong et al. (2011), que foi o primeiro a evidenciar o aumento do receptor ST2 após uma infecção no cérebro. Também foi observado um aumento da expressão de IL-33 nos sítios de lesão em função do tempo. Considerando que os efeitos inflamatórios da IL-33 dependem do aumento da expressão do receptor ST2 (HONG et al., 2011), o aumento dos receptores ST2 observado nos sítios da lesão de animais WT aos 14 dias, poderia estar envolvido com uma maior resposta e consequente maior reabsorção óssea.

A literatura relata que o número de osteoclastos aumenta consideravelmente na região periapical de dentes em que houve a necrose da polpa radicular quando comparado à região periapical de dentes sadios (controle) (ANAN et al., 1993). No presente estudo, o número de osteoclastos presentes na lesão periapical foi maior que o número de osteoclastos nos grupos controle. A análise do número de células TRAP+ presentes nas lesões de animais WT e ST2KO mostrou que, embora apresentasse tamanho de lesão menor, o número de osteoclastos presentes nas lesões periapicais de animais ST2KO foi maior que o número de osteoclastos observado nas lesões de animais WT. O maior número de osteoclastos em animais ST2KO foi observado em ambos os períodos experimentais estudados.

Na literatura a IL-33 vem sendo relacionada com a inibição da diferenciação osteoclástica, sugerindo que esta citocina exerce um papel importante ao inibir a reabsorção óssea. KELLER et al. (2012) demonstraram em suas análises que a maior liberação de IL-33 por osteoblastos promoveu a redução da osteoclastogênese *in vivo*, enquanto que SCHULZE et al. (2011) obtiveram resultados semelhantes *in vitro* em camundongos ST2KO. ZAISS et al. (2011) também observaram a inibição da formação de osteoclastos a partir da administração de IL-33 recombinante em

camundongos transgênicos para TNF. Os dados do presente estudo estão de acordo com os resultados encontrados na literatura.

Frente a estes dados discutidos até o momento e buscando definir de que maneira a lesão induzida nos camundongos ST2KO é menor em presença de maiores números de osteoclastos, isso nos faz levantar e testar duas hipóteses: a atividade mineralizadora de osteoblastos poderia estar maior em animais ST2KO, ou ainda, a capacidade reabsortiva de osteoclastos nos animais ST2KO poderia estar comprometida.

Assim, na tentativa de esclarecer tal questão, buscamos primeiramente determinar por meio da expressão de genes relacionados à formação óssea, se há uma maior atividade osteoblástica atuando no desenvolvimento, maturação e manutenção óssea. Os marcadores ósseos investigados foram Runx2, osteocalcina, fosfatase alcalina e colágeno tipo I. Observamos nos animais ST2KO, que aos 14 dias, há uma maior expressão de Runx2 no grupo com lesão quando comparado a seu respectivo controle. A expressão aumentada de Runx2 no animal ST2KO, que é um marcador de osteoblastos, poderia justificar a menor extensão da lesão nestes animais. Contudo, a expressão dos outros marcadores relacionados à formação óssea estava preservadas nos animais ST2KO com lesão. De fato, estudos *in vitro* de SAIDI et al. (2010) e SCHULZE et al. (2010) relatam que a IL-33 não apresenta influências sobre o número de osteoblastos e sobre a deposição de matriz mineralizada realizada por estas células.

Permanece a hipótese de que os osteoclastos envolvidos no processo de reabsorção óssea deste modelo nos animais ST2KO estão quantitativamente

presentes, porém são qualitativamente atípicos, com sua capacidade de reabsorção reduzida.

Assim, determinamos a expressão de genes relacionados à capacidade de reabsorção óssea como a catepsina K e MMP-9. Observou-se que a expressão de ambas as enzimas estavam significativamente prejudicadas em animais ST2KO, quando comparadas ao observado em animais WT.

Sabe-se que a MMP-9 atua removendo a camada de colágeno presente na superfície óssea, sendo essencial como iniciadora do processo de reabsorção óssea. (DELAISSÉ et al., 2000). E estudos sugerem que na fase inicial da lesão periapical os níveis aumentados de MMP-9 podem estar envolvidos com o desenvolvimento do processo inflamatório e com a degradação da matriz extracelular (COROTTI et al., 2009). Estudos de CARNEIRO et al. (2009), relatam haver menor expressão de MMP-9 no ligamento periodontal normal em relação aos sítios de lesão periapical, e que esta enzima desenvolve uma função destrutiva nos sítios de lesão periapical em progressão e desenvolvimento.

GAO et al. (2013), demonstraram a importância da catepsina K no processo de reabsorção óssea, uma vez que relatam uma redução do tamanho da lesão periapical e um processo inflamatório mais brando, quando o gene desta enzima é silenciado. Em nosso estudo, observamos menor expressão de Catepsina K e MMP-9 na lesão dos animais ST2KO quando comparadas à expressão na lesão dos animais WT. Esses dados sugerem que há uma menor degradação da matriz mineral nos animais ST2KO com consequente redução da reabsorção óssea e reduzido tamanho de lesão periapical, como mostrado em nossos resultados por histomorfometria e μ CT.

Resumidamente, os resultados obtidos permitiram determinar que a ausência da via IL-33/ST2 promove a indução de uma lesão periapical menor e com progressão mais lenta que não pode ser atribuída a alterações nas atividades osteoblásticas. A lesão periapical observada em animais ST2KO apresenta maior número de osteoclastos, cuja capacidade de reabsorção parece estar prejudicada uma vez que se observou menor expressão das enzimas MMP-9 e catepsina K, responsáveis pela degradação da matriz orgânica.

Até o momento, não existe nenhum estudo relacionando o papel do eixo IL-33/ST2 com o desenvolvimento de lesões periapicais e existem poucos artigos publicados que relacionam o papel da IL-33 na remodelação óssea, os quais ainda apresentam conclusões controversas. Portanto, este é o primeiro estudo que mostra o papel do eixo IL-33/ST2 no desenvolvimento e progressão da lesão periapical e mostra que a ativação deste eixo pode ser importante para o processo de ativação dos osteoclastos.

Conclusão

Com base nos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que na ausência do receptor ST2 as lesões periapicais são menos extensas e embora em maiores quantidades, os osteoclastos são menos ativos. Nossos resultados sugerem um importante papel da via IL-33/ST2 na ativação dos osteoclastos e desenvolvimento da lesão periapical.

Referências

---

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
2. Alves-Filho JC, Sônego F, Souto FO, Freitas A, Verri WA Jr, Auxiliadora-Martins M, et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med*. 2010 Jun;16(6):708-12.
3. Anan H, Akamine A, Maeda K. An enzyme histochemical study of the behavior of rat bone cells during experimental apical periodontitis. *J Endod*. 1993 Feb;19(2):83-6.
4. Arron JR, Choi Y. Bone versus immune system. *Nature*. 2000 Nov 30;408(6812):535-6.
5. Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*. 2007 Feb;40(2):251-64.
6. Baekkevold ES, Roussigné M, Yamanaka T, Johansen FE, Jahnsen FL, Amalric F, et al. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol*. 2003 Jul;163(1):69-79.
7. Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF-alpha release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int Endod J*. 1997 May;30(3):155-9.
8. Berger A. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ*. 2000 Aug 12;321(7258):424.
9. Blair HC, Robinson LJ, Zaidi M. Osteoclast signalling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Mar 18;328(3):728-38.

10. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 2011 Feb;26(2):229-38.
11. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther.* 2007;9 Suppl 1:S1.
12. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003 May 15;423(6937):337-42.
13. Carneiro E, Menezes R, Garlet GP, Garcia RB, Bramante CM, Figueira R, et al. Expression analysis of matrix metalloproteinase-9 in epithelialized and nonepithelialized apical periodontitis lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Jan;107(1):127-32.
14. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L, Aguilar L, et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jan 2;104(1):282-7.
15. Cayrol C, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jun 2;106(22):9021-6.
16. Chapuis J, Hot D, Hansmannel F, Kerdraon O, Ferreira S, Hubans C, et al. Transcriptomic and genetic studies identify IL-33 as a candidate gene for Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry.* 2009 Nov;14(11):1004-16.
17. Chen Z, Lin F, Gao Y, Li Z, Zhang J, Xing Y, et al. FOXP3 and ROR γ t: transcriptional regulation of Treg and Th17. *Int Immunopharmacol.* 2011 May;11(5):536-42.

18. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*. 2008 Aug;79(8 Suppl):1569-76.
19. da Luz FA, Oliveira AP, Borges D, Brígido PC, Silva MJ. The physiopathological role of IL-33: new highlights in bone biology and a proposed role in periodontal disease. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:342410.
20. Colić M, Gazivoda D, Vucević D, Vasilić S, Rudolf R, Lukić A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol Immunol*. 2009 Nov;47(1):101-13.
21. Corotti MV, Zambuzzi WF, Paiva KB, Menezes R, Pinto LC, Lara VS, et al. Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development. *Arch Oral Biol*. 2009 Aug;54(8):764-71.
22. De Rossi A, Rocha LB, Rossi MA. Application of fluorescence microscopy on hematoxylin and eosin-stained sections of healthy and diseased teeth and supporting structures. *J Oral Pathol Med*. 2007 Jul;36(6):377-81.
23. Delaissé JM, Engsig MT, Everts V, del Carmen Ovejero M, Ferreras M, Lund L, et al. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin Chim Acta*. 2000 Feb 15;291(2):223-34.
24. Dinarello CA. Interleukin-18, a proinflammatory cytokine. *Eur Cytokine Netw*. 2000 Sep;11(3):483-6.
25. Dziak R. Osteoimmunology: cross-talk between bone and immune cells. *Immunol Invest*. 2013;42(7):657-60.
26. Ferreira LM, Hochman B; Barbosa MV. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cir. Bras.*, São Paulo, v. 20, supl. 2, 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502005000800008&lng=en&nrm=iso.

27. Ferreira, PDF. Ausência do receptor Toll-Like 2 ocasionou a formação de lesões periapicais mais extensas e com maior número de osteoclastos em camundongos. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2011.
28. Franceschi RT, Ge C, Xiao G, Roca H, Jiang D. Transcriptional regulation of osteoblasts. *Cells Tissues Organs*. 2009;189(1-4):144-52.
29. Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol*. 2005 Apr;6(4):331-7.
30. Fouad A, Barry J, Russo J, Radolf J, Zhu Q. Periapical lesion progression with controlled microbial inoculation in a type I diabetic mouse model. *J Endod*. 2002 Jan;28(1):8-16.
31. Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, da Silva JS, Cunha FQ. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiol Immunol*. 2009 Feb;24(1):25-31.
32. Gao B, Chen W, Hao L, Zhu G, Feng S, Ci H, et al. Inhibiting periapical lesions through AAV-RNAi silencing of cathepsin K. *J Dent Res*. 2013 Feb;92(2):180-6.
33. Garlet GP, Martins W Jr, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2004 Aug;31(8):671-9.
34. Gazivoda D, Dzopalic T, Bozic B, Tatomirovic Z, Brkic Z, Colic M. Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. *J Oral Pathol Med*. 2009 Aug;38(7):605-11.

35. Gelb BD, Shi GP, Chapman HA, Desnick RJ. Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science*. 1996 Aug 30;273(5279):1236-8.
36. Geusens P, Lems WF. Osteoimmunology and osteoporosis. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(5):242.
37. Graunaite I, Lodiene G, Maciulskiene V. Pathogenesis of Apical Periodontitis: a Literature Review. *J Oral Maxillofac Res*. 2012 Jan 1;2(4):e1. eCollection 2012.
38. Greenfield EM, Bi Y, Miyauchi A. Regulation of osteoclast activity. *Life Sci*. 1999;65(11):1087-102.
39. Gowen M, Wood DD, Ihrie EJ, McGuire MK, Russell RG. An interleukin 1 like factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature*. 1983 Nov 24-30;306(5941):378-80.
40. Gustavo P. Garlet, Andreza M.F. Aranha, Elcia M. Silveira, Andreia Espindola Vieira, Celso M. Queiroz-Junior, Mila F.M. Madeira, et al. (2012). The Role of Chemokines and Cytokines in the Pathogenesis of Periodontal and Periapical Lesions: Current Concepts, Inflammation, Chronic Diseases and Cancer - Cell and Molecular Biology, Immunology and Clinical Bases, Dr Mahin Khatami (Ed.), ISBN: 978-953-51-0102-4, InTech, DOI: 10.5772/27252. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/inflammation-chronic-diseases-and-cancer-cell-and-molecular-biology-immunology-and-clinical-bases/the-role-of-chemokines-and-cytokines-in-the-pathogenesis-of-periodontal-and-periapical-lesions-curre>
41. Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Ishii KJ, Kawagoe T, Imoto Y, et al. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Jul;130(1):184-94.e11.
42. Haraldsen G, Balogh J, Pollheimer J, Sponheim J, Küchler AM. Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin? *Trends Immunol*. 2009 May;30(5):227-33.

43. Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, Tominaga S. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *J Biol Chem*. 2007 Sep 7;282(36):26369-80.
44. Hill PA, Murphy G, Docherty AJ, Hembry RM, Millican TA, Reynolds JJ, et al. The effects of selective inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) on bone resorption and the identification of MMPs and TIMP-1 in isolated osteoclasts. *J Cell Sci*. 1994 Nov;107 (Pt 11):3055-64.
45. Hong YS, Moon SJ, Joo YB, Jeon CH, Cho ML, Ju JH, et al. Measurement of interleukin-33 (IL-33) and IL-33 receptors (sST2 and ST2L) in patients with rheumatoid arthritis. *J Korean Med Sci*. 2011 Sep;26(9):1132-9.
46. Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. São Paulo: Artmed; 2007.
47. Jankovic D, Liu Z, Gause WC. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol*. 2001 Aug;22(8):450-7.
48. Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov*. 2008 Oct;7(10):827-40.
49. Kakkar R, Hei H, Dobner S, Lee RT. Interleukin 33 as a mechanically responsive cytokine secreted by living cells. *J Biol Chem*. 2012 Feb 24;287(9):6941-8.
50. Kawashima N, Stashenko P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol*. 1999 Jan;44(1):55-66.
51. Keller J, Catala-Lehnen P, Wintges K, Schulze J, Bickert T, Ito W, et al. Transgenic over-expression of interleukin-33 in osteoblasts results in decreased osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jan 6;417(1):217-22.

-
52. Kobori A, Yagi Y, Imaeda H, Ban H, Bamba S, Tsujikawa T, et al. Interleukin-33 expression is specifically enhanced in inflamed mucosa of ulcerative colitis. *J Gastroenterol*. 2010 Oct;45(10):999-1007.
53. Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest*. 2006 May;116(5):1202-9.
54. Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem*. 2012 Aug;45(12):863-73.
55. Kuo ML, Lamster IB, Hasselgren G. Host mediators in endodontic exudates. I. Indicators of inflammation and humoral immunity. *J Endod*. 1998 Sep;24(9):598-603.
56. Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, et al. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol*. 2009 Nov 15;183(10):6469-77.
57. Lee SK, Lorenzo J. Cytokines regulating osteoclast formation and function. *Curr Opin Rheumatol*. 2006 Jul;18(4):411-8.
58. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*. 2007 Aug 10;130(3):456-69.
59. Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Nov;1143:123-50.
60. Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, Ito IY, Bonifácio KC. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *J Endod*. 2002 Dec;28(12):815-8.

61. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol*. 2010 Feb;10(2):103-10.
62. Lin TC, Li CY, Tsai CS, Ku CH, Wu CT, Wong CS, et al. Neutrophil-mediated secretion and activation of matrix metalloproteinase-9 during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg*. 2005 Jun;100(6):1554-60.
63. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 22.3, Collagen: The Fibrous Proteins of the Matrix. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21582/>
64. Lüthi AU, Cullen SP, McNeela EA, Duriez PJ, Afonina IS, Sheridan C, et al. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity*. 2009 Jul 17;31(1):84-98.
65. Mak TW, Penninger JM, Ohashi PS. Knockout mice: a paradigm shift in modern immunology. *Nat Rev Immunol*. 2001 Oct;1(1):11-9.
66. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2000 Apr;21(2):115-37.
67. Marotti G. The osteocyte as a wiring transmission system. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2000 Dec;1(2):133-6.
68. Márton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2000 Jun;15(3):139-50.
69. Masrour Roudsari J, Mahjoub S. Quantification and comparison of bone-specific alkaline phosphatase with two methods in normal and paget's specimens. *Caspian J Intern Med*. 2012 Summer;3(3):478-83.

70. Menezes-Silva R, Khaliq S, Deeley K, Letra A, Vieira AR. Genetic susceptibility to periapical disease: conditional contribution of MMP2 and MMP3 genes to the development of periapical lesions and healing response. *J Endod.* 2012 May;38(5):604-7.
71. Metzger Z. Macrophages in periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 2000 Feb;16(1):1-8.
72. Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y, Sattar N, et al. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med.* 2008 Feb 18;205(2):339-46.
73. Miller AM. Role of IL-33 in inflammation and disease. *J Inflamm (Lond).* 2011 Aug 26;8(1):22.
74. Miller AM, Liew FY. The IL-33/ST2 pathway--A new therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther.* 2011 Aug;131(2):179-86.
75. Morimoto T, Yamasaki M, Nakata K, Tsuji M, Nakamura H. The expression of macrophage and neutrophil elastases in rat periradicular lesions. *J Endod.* 2008 Sep;34(9):1072-6.
76. Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One.* 2008 Oct 6;3(10):e3331.
77. Mullane KM, Kraemer R, Smith B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Methods.* 1985 Nov;14(3):157-67.
78. Mun SH, Ko NY, Kim HS, Kim JW, Kim do K, Kim AR, et al. Interleukin-33 stimulates formation of functional osteoclasts from human CD14(+) monocytes. *Cell Mol Life Sci.* 2010 Nov;67(22):3883-92.

- 79.Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Nov 1;15(6):348-81.
- 80.Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med*. 2011 Sep 11;17(10):1231-4.
- 81.Nawijn MC, Dingjan GM, Ferreira R, Lambrecht BN, Karis A, Grosveld F, et al. Enforced expression of GATA-3 in transgenic mice inhibits Th1 differentiation and induces the formation of a T1/ST2-expressing Th2-committed T cell compartment in vivo. *J Immunol*. 2001 Jul 15;167(2):724-32.
- 82.Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Morita H, Ishii A, et al. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Oct 26;107(43):18581-6.
- 83.Oboki K, Nakae S, Matsumoto K, Saito H. IL-33 and Airway Inflammation. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2011 Apr;3(2):81-8.
- 84.Palmer G, Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Toy D, Seemayer CA, Viatte S, et al. Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009 Mar;60(3):738-49.
- 85.Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem*. 1994 Jul;55(3):273-86.
- 86.Park JK, Rosen A, Saffitz JE, Asimaki A, Litovsky SH, Mackey-Bojack SM, et al. Expression of cathepsin K and tartrate-resistant acid phosphatase is not confined to osteoclasts but is a general feature of multinucleated giant cells: systematic analysis. *Rheumatology (Oxford)*. 2013 Aug;52(8):1529-33.
- 87.Particelli F, Mecozzi L, Beraudi A, Montesi M, Baruffaldi F, Viceconti M. A comparison between micro-CT and histology for the evaluation of cortical bone:

- effect of polymethylmethacrylate embedding on structural parameters. *J Microsc.* 2012 Mar;245(3):302-10.
88. Pastorelli L, Garg RR, Hoang SB, Spina L, Mattioli B, Scarpa M, et al. Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Apr 27;107(17):8017-22.
89. Pushparaj PN, Tay HK, H'ng SC, Pitman N, Xu D, McKenzie A, et al. The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jun 16;106(24):9773-8.
90. Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem.* 1999 Aug;45(8 Pt 2):1353-8.
91. Rocha CT, Rossi MA, Leonardo MR, Rocha LB, Nelson-Filho P, Silva LA. Biofilm on the apical region of roots in primary teeth with vital and necrotic pulps with or without radiographically evident apical pathosis. *Int Endod J.* 2008 Aug;41(8):664-9.
92. Rocha DAP, Pereira KMA, Gordón-Núñez MA, Carvalho RA, Galvão HC, Costa ALL. Formación de los granulomas y quistes radiculares: una revisión de los aspectos inmunopatológicos. *Rev ADM* 2007;64(3):91-6.
93. Roodman GD. Role of cytokines in the regulation of bone resorption. *Calcif Tissue Int.* 1993;53 Suppl 1:S94-8.
94. Rühli FJ, Kuhn G, Evison R, Müller R, Schultz M. Diagnostic value of micro-CT in comparison with histology in the qualitative assessment of historical human skull bone pathologies. *Am J Phys Anthropol.* 2007 Aug;133(4):1099-111.
95. Saidi S, Bouri F, Lencel P, Duplomb L, Baud'huin M, Delplace S, et al. IL-33 is expressed in human osteoblasts, but has no direct effect on bone remodeling. *Cytokine.* 2011 Mar;53(3):347-54.

96. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:531-62.
97. Saleh H, Eeles D, Hodge JM, Nicholson GC, Gu R, Pompolo S, et al. Interleukin-33, a target of parathyroid hormone and oncostatin m, increases osteoblastic matrix mineral deposition and inhibits osteoclast formation in vitro. *Endocrinology*. 2011 May;152(5):1911-22.
98. Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie AN, Lee RT. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest*. 2007 Jun;117(6):1538-49.
99. Sasaki H, Hou L, Belani A, Wang CY, Uchiyama T, Müller R, et al. IL-10, but not IL-4, suppresses infection-stimulated bone resorption in vivo. *J Immunol*. 2000 Oct 1;165(7):3626-30.
100. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med*. 2006 Nov 27;203(12):2673-82.
101. Scanlon ST, McKenzie AN. Type 2 innate lymphoid cells: new players in asthma and allergy. *Curr Opin Immunol*. 2012 Dec;24(6):707-12.
102. Schaffler MB, Kennedy OD. Osteocyte signaling in bone. *Curr Osteoporos Rep*. 2012 Jun;10(2):118-25.
103. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005 Nov;23(5):479-90.

104. Schulze J, Bickert T, Beil FT, Zaiss MM, Albers J, Wintges K, et al. Interleukin-33 is expressed in differentiated osteoblasts and blocks osteoclast formation from bone marrow precursor cells. *J Bone Miner Res*. 2011 Apr;26(4):704-17.
105. Seeman E, Delmas PD. Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med*. 2006 May 25;354(21):2250-61.
106. Segovia-Silvestre T, Neutzsky-Wulff AV, Sorensen MG, Christiansen C, Bollerslev J, Karsdal MA, et al. Advances in osteoclast biology resulting from the study of osteopetrotic mutations. *Hum Genet*. 2009 Jan;124(6):561-77.
107. Shui C, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Changes in Runx2/Cbfa1 expression and activity during osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*. 2003 Feb;18(2):213-21.
108. Silva TA, Garlet GP, Lara VS, Martins W Jr, Silva JS, Cunha FQ. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *Oral Microbiol Immunol*. 2005 Oct;20(5):310-6.
109. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997 Apr 18;89(2):309-19.
110. Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol 2000*. 2000 Oct;24:99-126.
111. Sponheim J, Pollheimer J, Olsen T, Balogh J, Hammarström C, Loos T, et al. Inflammatory bowel disease-associated interleukin-33 is preferentially expressed in ulceration-associated myofibroblasts. *Am J Pathol*. 2010 Dec;177(6):2804-15.
112. Stashenko P, Yu SM, Wang CY. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod*. 1992 Sep;18(9):422-6.

113. Stashenko P, Wang CY, Tani-Ishii N, Yu SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994 Oct;78(4):494-502.
114. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(4):498-521.
115. Sugiyama T, Nagasawa T. Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2012 Jun;11(3):201-6.
116. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000 Mar 17;100(6):655-69.
117. Tago K, Noda T, Hayakawa M, Iwahana H, Yanagisawa K, Yashiro T, et al. Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Aug 3;285(5):1377-83.
118. Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med (Berl)*. 2005 Mar;83(3):170-9. Epub 2005 Jan 26.
119. Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J*. 1998 Sep;31(5):311-25.
120. Takahashi K, MacDonald D, Murayama Y, Kinane D. Cell synthesis, proliferation and apoptosis in human dental periapical lesions analysed by in situ hybridisation and immunohistochemistry. *Oral Dis*. 1999 Oct;5(4):313-20.
121. Takayanagi H. New developments in osteoimmunology. *Nat Rev Rheumatol*. 2012 Nov;8(11):684-9.

122. Taşman F, Er N, Ataç A, Dağdeviren A, Kendir B. CD45/isotypes expression in the immune cells of human periapical lesions. *J Endod.* 2000 Mar;26(3):166-8.
123. Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, et al. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab.* 2007 Jun;5(6):464-75.
124. Thomassen E, Kothny G, Haas S, Danescu J, Hültner L, Dörmer P, et al. Role of cell type-specific promoters in the developmental regulation of T1, an interleukin 1 receptor homologue. *Cell Growth Differ.* 1995 Feb;6(2):179-84.
125. Tominaga S. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. *FEBS Lett.* 1989 Dec 4;258(2):301-4.
126. Verri WA Jr, Souto FO, Vieira SM, Almeida SC, Fukada SY, Xu D, et al. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis.* 2010 Sep;69(9):1697-703
127. Vieira JG. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arq Bras Endocrinol Metab*, São Paulo, v. 43, n. 6, Dec. 1999. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27301999000600005&lng=en&nrm=iso.
128. Von Stechow D, Balto K, Stashenko P, Müller R. Three-dimensional quantitation of periradicular bone destruction by micro-computed tomography. *J Endod.* 2003 Apr;29(4):252-6.
129. Wei S, Kawashima N, Suzuki N, Xu J, Takahashi S, Zhou M, et al. Kinetics of Th17-related cytokine expression in experimentally induced rat periapical lesions. *Aust Endod J.* 2013 Dec;39(3):164-70.

130. Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante AW Jr, Ahmed-Ansari A, Sell KW, Pollard JW, et al. Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jun;87(12):4828-32.
131. Xu D, Chan WL, Leung BP, Huang Fp, Wheeler R, Piedrafita D, et al. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type1 helper T cells. *J Exp Med*. 1998 Mar 2;187(5):787-94.
132. Yamaza T, Goto T, Kamiya T, Kobayashi Y, Sakai H, Tanaka T. Study of immunoelectron microscopic localization of cathepsin K in osteoclasts and other bone cells in the mouse femur. *Bone*. 1998 Dec;23(6):499-509.
133. Yang S, Zhu L, Xiao L, Shen Y, Wang L, Peng B, et al. Imbalance of interleukin-17+ T-cell and Foxp3+ regulatory T-cell dynamics in rat periapical lesions. *J Endod*. 2014 Jan;40(1):56-62.
134. Yu JT, Song JH, Wang ND, Wu ZC, Zhang Q, Zhang N, et al. Implication of IL-33 gene polymorphism in Chinese patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2012 May;33(5):1014.e11-4.
135. Yu SM, Stashenko P. Identification of inflammatory cells in developing rat periapical lesions. *J Endod*. 1987 Nov;13(11):535-40.
136. Yuan FL, Li X, Lu WG, Li CW, Xu RS, Dong J. IL-33: a promising therapeutic target for rheumatoid arthritis? *Expert Opin Ther Targets*. 2011 May;15(5):529-34.
137. Yun TJ, Chaudhary PM, Shu GL, Frazer JK, Ewings MK, Schwartz SM, et al. OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *J Immunol*. 1998 Dec 1;161(11):6113-21.

138. Zaiss MM, Kurowska-Stolarska M, Böhm C, Gary R, Scholtysek C, Stolarski B, et al. IL-33 shifts the balance from osteoclast to alternatively activated macrophage differentiation and protects from TNF-alpha-mediated bone loss. *J Immunol*. 2011 Jun 1;186(11):6097-105.

139. Zhang S, Xiao Z, Luo J, He N, Mahlios J, Quarles LD. Dose-dependent effects of Runx2 on bone development. *J Bone Miner Res*. 2009 Nov;24(11):1889-904.

140. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 1997 May 16;89(4):587-96.

Anexo

ANEXO A – Ofício do comitê de ética no uso de animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 163/2011, sobre o projeto intitulado "*Papel da IL-33 na modulação das lesões periapicais em camundongos*", sob a responsabilidade da **Professora Doutora Sandra Yasuyo Fukada Alves** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 12 de dezembro de 2011.

(We certify that the protocol nº 163/2011, about "*The role of IL-33 in the modulation of periapical lesions in mice*", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 12/12/2011.

Ribeirão Preto, 12 de dezembro de 2011.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal