UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

FERNANDA REGINA RIBEIRO SANTOS

**CICLOOXIGENASE-2 MODULA *IN VIVO* A EXPRESSÃO DE
MARCADORES DA OSTEOLASTOGÊNESE E GENES ENVOVIDOS NO
METABOLISMO ÓSSEO EM RESPOSTA AO LIPOPOLISSACARÍDEO
BACTERIANO**

Ribeirão Preto

2012

FERNANDA REGINA RIBEIRO SANTOS

**CICLOOXIGENASE-2 MODULA *IN VIVO* A EXPRESSÃO DE
MARCADORES DA OSTEOCLASTOGÊNESE E GENES ENVOVIDOS NO
METABOLISMO ÓSSEO EM RESPOSTA AO LIPOPOLISSACARÍDEO
BACTERIANO**

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

Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientador: Dr. Francisco W. G. de Paula e Silva

Ribeirão Preto

2012

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Fernanda Regina Ribeiro

Ciclooxigenase-2 Modula *In Vivo* a Expressão de Marcadores da Osteoclastogênese e Genes Envolvidos no Metabolismo Ósseo em Resposta ao Lipopolissacarídeo Bacteriano. Ribeirão Preto, 2012.

67 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientador: Paula-Silva, Francisco Wanderley Garcia

1. Lipopolissacarídeo bacteriano, 2. Ciclooxigenase-2
3. 5-Lipoxigenase, 4. Osteoclastogênese, 5. RANK, 6. RANKL 7. OPG,
8. Metabolismo ósseo, 9. Indometacina

FOLHA DE APROVAÇÃO

**SANTOS, FRR. CICLOOXIGENASE-2 MODULA *IN VIVO* A EXPRESSÃO DE
MARCADORES DA OSTEOLASTOGÊNESE E GENES ENVOVIDOS NO
METABOLISMO ÓSSEO EM RESPOSTA AO LIPOPOLISSACARÍDEO BACTERIANO**

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

Área de Concentração: Odontopediatria.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

FERNANDA REGINA RIBEIRO SANTOS

Nascimento	8 de junho de 1984 – Maceió/AL
Filiação	Carlos Henrique Bezerra Santos Neusa Ribeiro Santos
2003-2008	Curso de Graduação Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alagoas – FOUFAL/UFAL
2009-2011	Curso de Especialização em Odontopediatria Associação Odontológica de Ribeirão Preto - AORP
2009-2012	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível de Mestrado na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP

Trabalho realizado com apoio financeiro do Programa Auxílio à Pesquisa Jovem Pesquisador da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP** processo 2010/17611-4).

DEDICATÓRIA

A **Deus**, pela alegria da vida e por Te sentir tão presente em mim. Por guiar meus passos, mostrando sempre o melhor caminho. Por colocar pessoas boas em minha vida e por me fazer crer no amor. Obrigada por acalmar meu coração nos momentos em que o desânimo se fez presente e por me encher de forças quando tive medo.

Obrigada pelos anjos que colocaste ao meu lado, que me ajudaram nessa conquista. Obrigada a Ti, por me fazer merecer tantas bênçãos!

Ainda que eu fale a língua dos homens e dos anjos, se não tiver amor, serei como o bronze que soa ou como o címbalo que retine. Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei. (...) Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três. Porém, o maior deles é o amor..." 1 Coríntios 13, 1-13.

Aos meus pais **Neusa Ribeiro Santos** e **Carlos Henrique Bezerra Santos**, pelo amor constante e pela educação recebida. Por sempre estarem presentes em todos os momentos da minha vida. Por nada ter mudado, mesmo estando a tantos quilômetros de distância. Por sempre confiarem em mim e me apoiarem em todas as minhas escolhas. Tenho em vocês o maior exemplo de dignidade, humildade e fraternidade. Obrigada por não medirem esforços, sempre investindo em minha educação e me incentivando em todos os momentos. Vocês são os grandes responsáveis por esta conquista e merecedores de tamanha alegria. Obrigada por serem os meus melhores amigos e sempre serão "a mainha e o painho". Amo vocês...

A minha irmã **Lenda Vanessa de Lima Pinheiro**, um anjo de luz! Por todo amor que existe entre nós. Você pra mim é sinônimo de garra, força e perseverança. Obrigada por estar tão presente, mesmo tão longe...

A minha avó **Amélia Bezerra Santos** (in memoriam), que sempre esteve presente em meu coração. Sinto sua presença viva em mim e sei o quanto você ficaria feliz com essa conquista.

À família **Oliveira Irineu**, por me receber como uma filha. Por me fazer sentir o aconchego de um lar e me oferecer imenso amor. Não tenho palavras para expressar tamanha gratidão. Obrigada por todo carinho, alegria e entusiasmo que vocês me proporcionaram desde o primeiro momento. Sinto-me abençoada por tê-los em minha vida! Amo vocês, tia Maria, tio Valter e Thininha.

Ao **Jerônimo Mañço de Oliveira Neto**, meu namorado, confidente, cúmplice, companheiro e amigo... Obrigada pela paciência, por sempre estar ao meu lado nas horas boas e também nos momentos difíceis, pelos conselhos e por acreditar em mim. Devo muito dessa vitória a você, Jê! Tenho uma admiração imensa por ti, por esse teu coração tão grandioso. Agradeço a Deus por tê-lo comigo e por caminharmos juntos na estrada da vida. Te amo, meu amor!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva**, que esteve presente em todo percurso deste trabalho, sempre disposto a me ensinar e me ver crescer. Por toda paciência ao me conduzir nos primeiros passos do mundo científico. Por abrir meus olhos, mostrando o certo e o errado. Pelo bom humor nas horas difíceis, dedicação, disponibilidade e apoio. Francisco, você pra mim é o maior exemplo de sabedoria e esforço. Agradeço a Deus por tê-lo como orientador, desde o princípio. Muito obrigada!

Ao **Prof.Dr.Paulo Nelson Filho**, pela acolhida e por todos os ensinamentos transmitidos, sempre da melhor maneira. Obrigada por acreditar em mim e sempre estar disposto a me ajudar. Professor, o senhor é exemplo de dedicação e competência para mim. Obrigada por todo apoio, desde o início!

À **Profª.Drª. Maria Cristina Borsatto**, pela amizade e carinho. Cris, sinto uma alegria enorme em poder dividir com você tantos momentos, durante essa etapa de minha vida. Seus conselhos e palavras de carinho me ajudaram imensamente a superar os obstáculos da vida. Obrigada por fazer parte da minha vida e ser essa pessoa tão especial!

Aos meus queridos professores da Universidade Federal de Alagoas/UFAL, **Amaro Carlos Júnior, Dulce Maria Santos Simões e Edgar Norões Rodrigues da Mata**, que além de grandes mestres, se tornaram grandes amigos. Devo essa vitória ao grande apoio que recebi de vocês num momento decisivo de minha vida. Minha admiração e carinho sempre serão eternos, muito obrigada!

Aos anjos, que alguns chamam de amigos... **Marina Fernandes de Sena, Renato Petille, Geyson Galo da Silva e Igor Petean.** Obrigada pela grande ajuda que vocês me ofereceram, me apoiando e me auxiliando na execução da parte experimental deste estudo. Não tenho palavras pra agradecer a boa vontade e disponibilidade prestada. Tenho um carinho muito especial por vocês!

Às queridas amigas, **Iliana Ferraz Sabbatini, Danielle Torres de Azevedo, Maya Fernanda Manfrin Arnez e Késsia Suênia Fidelis de Mesquita,** que foram essenciais nessa trajetória. Durante muitos momentos vocês foram como irmãos para mim. Obrigada por compreenderem o que às vezes o meu olhar dizia. É uma dádiva tê-las como minhas amigas!

MEUS AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual diretor **Prof.Dr.Valdemar Mallet da Rocha Barros**.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da **Prof^á.Dr^a.Léa Assed Bezerra da Silva** e do Vice-Coordenador **Prof.Dr.Paulo Nelson Filho**.

Aos Professores do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo **Prof^á.Dr^a.Sada Assed**, **Prof^á.Dr^a.Léa Assed Bezerra da Silva**, **Prof^á.Dr^a.Aldevina Campos Freitas**, **Prof.Dr. Paulo Nelson Filho**, **Prof^á.Dr^a.Alexandra Mussolino de Queiroz**, **Prof.Dr.Mário Roberto Leonardo**, **Prof^á.Dr^a.Kranya Victória Díaz Serrano**, **Prof^á.Dr^a.Maria Cristina Borsatto**, **Prof^á.Dr^a.Raquel Assed Bezerra da Silva**, **Prof^á.Dr^a.Andiara De Rossi**, **Prof^á.Dr^a.Mírian Aiko Nakane Matsumoto**, **Prof^á. Dr^a Maria Bernadete Sasso Stuaní**, **Prof.Dr.José Tarcísio Lima Ferreira**, **Prof.Dr. Adilson Thomazinho**, **Prof^á.Dr^a.Maria da Conceição Pereira Saraiva** e **Prof.Dr. Fábio Lourenço Romano**, pela agradável convivência, pelas conversas atenciosas e pelos valiosos ensinamentos.

A **Prof^á.Dr^a.Lúcia Helena Faccioli** e membros do Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses e ao **Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura** e membros do Laboratório de Bioquímica Clínica, ambos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, por disponibilizarem o espaço físico e os equipamentos sob sua responsabilidade para utilização nesta pesquisa.

Aos **professores da banca**, pela atenção dispensada na leitura desta dissertação.

Às amigas da minha turma de Pós-Graduação, **Elaine Machado Pingueiro**, **Iliana Ferraz Sabbatini**, **Késsia Suênia Fidelis de Mesquita** e **Ligia Maria Napolitano Gonçalves**, por fazerem nossa turma ser tão especial. Agradeço pelo convívio, companheirismo, pelas risadas e acima de tudo, pela amizade construída.

Aos colegas da Pós-Graduação, Camila Scatena, Cíntia Guimarães de Almeida, Luciane Almeida do Carmo, Marcela Martin Del Campo Fierro, Marília Pacífico Lucisano, Paula Dariana Fernandes Ferreira, Rodrigo Alexandre Valério, Talitha de Siqueira Mellara, Carolina Paes Torres Mantovani, Cristhiane Ristum Bagatin Rossi, Cristiane Tomaz Rocha, Fabrício Kitazono de Carvalho, Jaciara Miranda Gomes da Silva, Cristina Bueno Brandão, Leonardo Bísaro Pereira, Marcela Cristina Damião Andrucioli, Ana Zilda Nazar Bergamo, Marta Maria Martins Giamatei Contente, Milena Silva Campos, Giselle de Angelo Souza Leite, Cristhiane Ristum Bagatin Rossi, Rodrigo Galo, Alessandra Marques Corrêa Afonso, Katharina Morant Holanda de Oliveira, Priscilla Coutinho Romualdo, Danielle Lucca Longo, Larissa Nogueira Soares Ribeiro, Denise de Souza Matos, Danielly Cunha Araújo Ferreira, Ana Caroline Fumes, Mariana Alencar Nemezio, Karina Alessandra Michelão Grecca Pierone, Bárbara Jarreta, Driely Barreiros de Oliveira e Silvana Aparecida Fernandes Polizeli pela agradável convivência, e valiosos momentos compartilhados.

Aos grandes amigos que conquistei em Ribeirão Preto, que de alguma forma contribuíram para realização desse sonho, Isadora Almeida Poscidônio, Felipe Augusto Godoy, Rúbia Franco Vilela de Almeida, Juliana Elias de Oliveira, Soraia Barbosa Bernardes Ferreira e Daniella Cristina Borges. A energia positiva de vocês foi contagiante e valiosa nesse momento único de minha vida. Pra mim é um privilégio tê-los ao meu lado e poder compartilhar de momentos tão valiosos. Obrigada pelos conselhos, palavras doces e principalmente pela alegria em ter uma amizade como a de vocês.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social, Da Fundação Odontológica de Ribeirão Preto (FUNORP) e Da Clínica de Pacientes Especiais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Filomena Leli Placciti, Micheli Cristina Leite Rovanholo, Matheus Morelli Zanela, Vera do Nascimento Scandelay, Marco Antonio dos Santos, Nilza Letícia Magalhães, Fátima Aparecida Rizoli, Rosemary Alves, Fátima Aparecida Jacinto Daniel, Renata Cristina Rosa, Benedita Viana Rodrigues e Renata Aparecida Fernandes, pela alegre convivência.

Aos funcionários do Biotério I, **Antônio Sérgio Aparecido Mesca, Antônio Massaro e Aline Aparecida Ferraresi Tiballi**, pela ajuda e disponibilidade durante a realização dos procedimentos experimentais em camundongos.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Isabel Cristina Galino Sola, Regiane Cristina Moi Sacilloto e Leandro Marin Silva**, pela atenção e por estarem sempre à disposição.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para concretização deste trabalho. Muito obrigada!

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo suporte financeiro concedido.

RESUMO

SANTOS FRR. CICLOOXIGENASE-2 MODULA *IN VIVO* A EXPRESSÃO DE MARCADORES DA OSTEOCLASTOGÊNESE E GENES ENVOVIDOS NO METABOLISMO ÓSSEO EM RESPOSTA AO LIPOPOLISSACARÍDEO BACTERIANO [DISSERTAÇÃO]. RIBEIRÃO PRETO: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO, 2012. 67 F.

Durante a resposta inflamatória, diversos mediadores são liberados localmente com o objetivo de estimular a resposta imune celular e humoral. Por meio da ação das enzimas ciclooxigenases e lipoxigenases ocorrerão modificações estruturais na cadeia do ácido araquidônico levando a síntese de prostaglandinas ou leucotrienos e lipoxinas, respectivamente. Tais mediadores são responsáveis pela regulação da expressão dos genes RANK, RANKL e OPG, moduladores da osteoclastogênese. Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão do RNA mensageiro (RNAm) para as enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico, ciclooxigenase-2 (COX-2) e 5-lipoxigenase (5-LO), e para os mediadores da osteoclastogênese (RANK, RANKL e OPG) no tecido ósseo, após inoculação de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) nos canais radiculares de molares de camundongos. Posteriormente foi investigado o efeito do bloqueio farmacológico da via COX-2 induzida pelo LPS, na expressão de mediadores da osteoclastogênese e de genes envolvidos no metabolismo ósseo. Foram utilizados 144 camundongos C57BL/6, com 6 semanas de idade, pesando de 18 a 20 gramas, nos quais os canais radiculares dos primeiros molares foram inoculados com uma solução contendo lipopolissacarídeo bacteriano de *E. coli* (0,1, 1,0 e 10mg/ml). Decorridos os períodos experimentais de 7, 14, 21 e 28 dias, os animais foram submetidos à eutanásia e os blocos contendo dente e osso foram removidos para extração do RNA total. Em seguida, foi realizada a avaliação da expressão gênica por meio de transcrição reversa e reação da polimerase em cadeia em tempo real (qRT-PCR). A análise global da expressão de RNAm para proteínas envolvidas no metabolismo ósseo foi realizada por meio de um ensaio de PCR Array (Osteogenesis RT² Profiler PCR Array). Os valores de expressão relativa de cada RNAm, para cada grupo, foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni ou por ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$). A inoculação de LPS nos canais radiculares de molares de camundongos foi capaz de induzir a expressão dos genes *PTGS2* e *ALOX5*, responsáveis pela codificação das enzimas COX-2 e 5-LO, envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico, concomitantemente à modulação da expressão dos genes *TNFRSF11A*, *TNFSF11* e *TNFRSF11B*, responsáveis pela codificação dos moduladores da osteoclastogênese RANK, RANKL e OPG, respectivamente. A administração de Indometacina, um inibidor não seletivo de COX-2, inibiu a expressão de RNAm para RANK e RANKL e estimulou a expressão de OPG durante os períodos iniciais de resposta à inoculação de LPS nos canais radiculares. A inibição da via COX-2 de metabolismo do ácido araquidônico nos períodos iniciais de resposta à inoculação de LPS nos canais radiculares modulou diferencialmente a expressão de genes envolvidos no catabolismo e anabolismo ósseo, indicando possíveis papéis para os mediadores derivados no ácido araquidônico na regulação do metabolismo ósseo. Estes resultados sugerem alvos terapêuticos importantes para intervenção precoce em doenças inflamatórias, como lesões periapicais para evitar a reabsorção do tecido ósseo.

Palavras-chave: lipopolissacarídeo bacteriano, ciclooxigenase-2, 5-lipoxigenase, osteoclastogênese, RANK, RANKL, OPG, metabolismo ósseo, Indometacina.

ABSTRACT

SANTOS FRR. CICLOOXYGENASE-2 MODULATES *IN VIVO* THE EXPRESSION OF OSTEOCLASTOGENESIS MARKERS AND GENES INVOLVED IN BONE METABOLISM IN RESPONSE TO BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDE [DISSERTATION]. RIBEIRÃO PRETO: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO, 2012. 67 P.

During an inflammatory response, several mediators are locally released in order to stimulate cellular and humoral immune response. Through the action of cyclooxygenase and lipoxygenase enzymes structural changes occur in the arachidonic acid chain leading to synthesis of prostaglandins or leukotrienes and lipoxins, respectively. Such mediators are responsible for the regulation of RANK, RANKL and OPG gene expression, osteoclastogenesis modulators. Thus, the objective of this study was to evaluate the expression of messenger RNA (mRNA) for the enzymes involved in arachidonic acid metabolism, cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LO), and the osteoclastogenesis mediators (RANK, RANKL and OPG) in bone tissue after injection of bacterial lipopolysaccharide (LPS) in murine dental root canals. Then, COX-2 pathway was pharmacologically blocked for investigation of expression of osteoclastogenesis mediators and genes involved in bone metabolism. We used 144 C57BL/6 mice, 6 weeks-old, weighing 18-20 grams, which had the first molars root canals inoculated with a solution containing LPS from *E. coli* (0.1, 1.0 and 10 mg/ml). After 7, 14, 21 and 28 days the animals were euthanized and the tooth-and-bone blocks were removed for total RNA extraction. Subsequently, the evaluation of gene expression was performed by reverse transcription and polymerase chain reaction in real time (qRT-PCR). Global analysis of mRNA expression for proteins involved in bone metabolism was performed using PCR arrays (Osteogenesis RT² Profiler PCR Array). The values for relative expression of each mRNA for each group were compared using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-test or one-way ANOVA followed by Dunnett's test ($\alpha=0.05$). The injection of LPS into the root canals was induced expression of genes *PTGS2* and *ALOX5*, responsible for encoding COX-2 and 5-LO enzymes, involved in the metabolism of arachidonic acid, simultaneously to the modulation of gene expression of *TNFRSF11A*, *TNFSF11* and *TNFRSF11B*, responsible for encoding the osteoclastogenesis modulators RANK, RANKL and OPG, respectively. Administration of Indomethacin, a non-selective inhibitor of COX-2, inhibited the expression of mRNA for RANK and RANKL and stimulated the expression of OPG during the initial response to the root canals contamination with LPS. Inhibition of the COX-2 pathway from arachidonic acid metabolism in the initial periods of response to LPS injection into the root canals differentially modulated the expression of genes involved in bone catabolism and anabolism, indicating possible roles for mediators derived from arachidonic acid in the regulation of bone metabolism. These results suggest important therapeutic targets for early intervention in inflammatory diseases such as apical periodontitis to avoid resorption of bone tissue.

Key-words: bacterial lipopolysaccharide, cyclooxygenase-2, 5-lipoxygenase, osteoclastogenesis, RANK, RANKL, OPG, bone metabolism, indomethacin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 PROPOSIÇÃO.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4 RESULTADOS	34
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	60
ANEXO	

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A polpa é um tecido conjuntivo frouxo localizado no interior dos canais radiculares do elemento dental. Esse tecido apresenta capacidade de defesa diante de estímulos pró-inflamatórios advindos das lesões de cárie, caracterizada pela deposição de um tecido mineralizado com o objetivo de isolar o agente agressor (Lee et al., 2006; Paula-Silva et al., 2009). Quando essa defesa é vencida, a polpa dental se torna contaminada por microrganismos oriundos das lesões de cárie, o tecido pulpar é destruído e ocorre o aparecimento da lesão periapical (Martón e Kiss, 2000).

A lesão periapical representa uma reposta imuno-inflamatória localizada, direcionada contra os microrganismos presentes no interior do canal radicular (Martón e Kiss, 2000), e caracterizada pela presença de um infiltrado inflamatório misto, composto por neutrófilos, macrófagos, linfócitos T e B e plasmócitos, de acordo com o estágio da doença (Liapatas et al., 2003). Em regiões que apresentam infiltrado inflamatório periapical, dois padrões de resposta podem ser gerados, o tipo T *helper* 1 (Th1) e T *helper* 2 (Th2), caracterizados pela produção de interleucina-2 (IL-2), interleucina-12 (IL-12) e interferon gama (INF- γ), e por interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13), respectivamente (Jankovic et al., 2001; Abbas et al., 2008; De-Rossi et al., 2008). Diversos microrganismos, incluindo bactérias, induzem o recrutamento de células Th1, as quais produzem IFN- γ , citocina responsável pela ativação de fagócitos (Abbas et al., 2008). A resposta inflamatória não controlada na região periapical leva à reabsorção dos tecidos ósseo e dentário, culminando com a perda do dente (Martón e Kiss, 2000; Suzuki et al., 2002).

O lipopolissacarídeo bacteriano (LPS ou endotoxina) é um componente das bactérias gram-negativas e potente estimulador da resposta imunológica, liberado principalmente quando essas bactérias morrem. O LPS está presente na parede celular das bactérias gram-negativas e contém tanto componentes lipídicos quanto porções polissacarídicas, sendo o lípide A considerado a porção tóxica da molécula (McGee et al., 1992; Rietschel e Brade, 1992; Abbas et al., 2008).

Durante a resposta inflamatória, diversos mediadores bioquímicos são liberados localmente com o objetivo de estimular a resposta imune celular e

humoral. Dentre estes mediadores inflamatórios estão os eicosanóides, os quais são sintetizados a partir da metabolização do ácido araquidônico, produzido pela ação das enzimas fosfolipases. Por meio da ação das enzimas ciclooxigenases (COX) ou lipoxigenases (LO) ocorrerão modificações estruturais na cadeia do ácido araquidônico, levando a síntese de prostaglandinas e tromboxanos ou leucotrienos e lipoxinas, respectivamente (Fiorucci et al., 2001; Clària, 2003; Zhang et al., 2003; Robbins et al., 2010).

Quando ocorre estresse celular, quer seja físico, bioquímico ou funcional, os fosfolípídeos constituintes da membrana citoplasmática e de corpúsculos lipídicos, são utilizados para síntese de prostaglandinas e leucotrienos. Este processo inicia-se devido a uma redução da concentração intracelular de trifosfato de adenosina (ATP) durante o estresse celular, o que leva a um decorrente aumento da permeabilidade ao cálcio, com maior influxo para o interior da célula. Muitas vias metabólicas são ativadas pelo cálcio, dentre elas as vias da fosfolipase A₂ e fosfolipase C, as quais levam à fragmentação dos fosfolípídios das membranas celulares e geração de moléculas de ácido araquidônico (Fiorucci et al., 2001; Clària e Romano, 2005; Gonzalez-Pérez e Clària, 2007; Massoumi e Sjolander, 2007; Pidgeon et al., 2007; Consolaro et al., 2009; Robbins et al., 2010; Steinhilber et al., 2010).

Sabe-se que a enzima ciclooxigenase pode se apresentar em isoformas distintas, denominadas COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1 é produzida em resposta a estímulos inflamatórios e também se expressa constitutivamente na maioria dos tecidos. Assim, a COX-1 é responsável não somente pela produção de prostaglandinas envolvidas na inflamação, mas também atua na homeostasia. Por outro lado, a COX-2 estimula a produção de prostaglandinas envolvidas na reação inflamatória e não é encontrada na maioria dos tecidos em condições normais (Charlier e Michaux, 2003; Clària, 2003; Consolaro et al., 2009; Robbins et al., 2010). A enzima COX-3 foi encontrada principalmente no córtex, coração e rins de roedores e humanos, entretanto sua função é pouco conhecida (Hersh et al., 2005). A endotoxina estimula os leucócitos a liberarem citocinas, tais como IL-1 e TNF, que aumentam a síntese da enzima COX-2 (Abbas et al., 2008).

Parte das moléculas de ácido araquidônico sofre ação da ciclooxigenase, porém, outra parte é submetida à ação da lipoxigenase. Na via da lipoxigenase, os produtos iniciais são gerados por três lipoxigenases diferentes (5-LO, 12-LO e 15-

LO). A 5-lipoxigenase (5-LO) é a enzima predominante nos neutrófilos. À ativação celular, a 5-LO transfere-se para a membrana nuclear e interage com uma proteína reguladora associada à membrana, denominada proteína ativadora de 5-LO (FLAP), para formar o complexo enzimático ativo. O principal produto, 5-HPETE (ácido hidroperoxieicosatetraenóico), é gerado a partir da inserção de um oxigênio molecular no carbono 5 do ácido araquidônico e, a seguir, convertido em uma família de compostos coletivamente conhecidos como leucotrienos (Back, 2002; Charlier et al., 2003; Clària e Romano, 2005; Bozza et al., 2007; Khanapure et al., 2007; Radmark et al., 2007; Massoumi e Sjolander, 2007; Hikiji et al., 2008; Consolaro et al., 2009; Radmark e Samuelsson, 2009; Haeggström et al., 2010; Radmark e Samuelsson, 2010; Robbins et al., 2010; Singh et al., 2010; Steinhilber et al., 2010; Goodman et al., 2011; Boudreau et al., 2011). Por outro lado, as enzimas 12-LO e 15-LO geram 12- e 15-HPETES, os quais são convertidos em 12-HETE e 15-HETE, respectivamente, para produção de lipoxinas (Gonzalez-Pérez e Clària, 2007; Khanapure et al., 2007; Harizi et al., 2008; Robbins et al., 2010; Greene et al., 2011).

Os leucotrienos apresentam importantes funções biológicas, entre as quais uma eficiente ação quimiotática, agregação e degranulação de polimorfonucleares, bem como estimulam a aderência dos leucócitos à parede endotelial para transmigração das células inflamatórias (Pidgeon et al., 2007; Wymann e Schneider, 2008; Consolaro et al., 2009; Robbins et al., 2010; Thomas e Puleo, 2011).

A presença de mediadores lipídicos como a prostaglandina E_2 (PGE_2) e os leucotrienos B_4 e C_4 foi previamente demonstrada em lesões periapicais de humanos (Torabinejad et al., 1992). Experimentalmente, a contaminação dos canais radiculares em ratos submetidos ao tratamento com corticosteróide (Dexametasona) levou ao desenvolvimento de lesões periapicais de menor extensão se comparados ao grupo controle (sem Dexametasona) (Metzger et al., 2002), sugerindo que os eicosanóides estão envolvidos no desenvolvimento da lesão periapical. Ainda, a administração de um medicamento inibidor não-seletivo das ciclooxigenases (Indometacina) durante o desenvolvimento da lesão periapical resultou em menor intensidade do infiltrado inflamatório concomitantemente a menor reabsorção do tecido ósseo (Oguntebi et al., 1989). Outros estudos em roedores (Bezerra et al., 2000; Lin et al., 2002; Gurgel et al., 2004; Vardar et al., 2005; Holzhausen et al., 2009) têm demonstrado que o uso de drogas antiinflamatórias não-esteróides

(AINEs), inibidoras da enzima ciclooxygenase, pode levar a redução da inflamação e perda óssea.

A reabsorção óssea é um processo que envolve uma série de etapas, sendo iniciado com a proliferação de precursores de osteoclastos advindos de monócitos da linhagem hematopoiética, seguindo com a sua diferenciação e maturação, levando finalmente a degradação de matrizes orgânicas colagênicas e inorgânicas do tecido ósseo, por meio da ação de metaloproteinases da matriz (Tay et al., 2004; Gallagher, 2008; Paula-Silva et al., 2010; Trouvin e Goeb, 2010).

Diversas citocinas e fatores de crescimento são essenciais para diferenciação e maturação dos osteoclastos. Dentre esses, podemos citar as interleucinas (IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, IL-15, IL-17, IL-18), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e fator estimulador de formação de colônia de monócitos (CSF2 e CSF3) (Bar-Shavit, 2007). Esses fatores atuam pela estimulação das células progenitoras de osteoclastos ou participando em um sistema parácrino, no qual estão envolvidos os osteoblastos e células da medula óssea. Este sistema parácrino é essencial para o metabolismo do osso e seus mediadores incluem as moléculas RANK (Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B), ligante para RANK (RANKL) e OPG (Osteoprotegerina).

Sabe-se que o sistema RANK/RANKL/OPG é responsável pela modulação da osteoclastogênese. RANK é o receptor expresso na superfície dos osteoclastos e seus progenitores, células dendríticas e células T ativadas (Boyle et al., 2003; Lerner, 2004; Wang e McCauley, 2011). RANKL é um mediador solúvel sintetizado por osteoblastos, células do estroma da medula óssea e células endoteliais, que ativa os osteoclastos quando se liga ao seu receptor, RANK. RANKL é um membro da superfamília do fator de necrose tumoral, sendo considerada a mais importante citocina envolvida em vários estágios da reabsorção óssea (Sabeti et al., 2005; Leibbrandt e Penninger, 2008). RANKL é necessário para induzir a expressão de genes que especificam a linhagem osteoclástica, incluindo os genes que codificam a enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), catepsina K e o receptor para calcitonina, conduzindo assim à maturação de osteoclastos (Boyle et al., 2003; Lau et al., 2005). Os efeitos de RANKL são bloqueados por receptores solúveis, como a osteoprotegerina (OPG), secretada por osteoblastos (Lerner, 2004). A OPG é um receptor solúvel que ao se ligar a RANKL, impede sua ligação ao receptor RANK, inibindo a diferenciação de osteoclastos (Jin et al., 2007). A superexpressão de OPG

bloqueia a maturação dos osteoclastos, levando ao desenvolvimento de osteopetrose em ratos, bem como a deleção do gene para OPG resulta no aumento da remodelação óssea, induzindo o desenvolvimento de osteoporose (Kearns et al., 2008; Anandarajah, 2009).

Descoberto inicialmente em linfócitos T, em 1986, o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) regula a expressão de diversos genes, principalmente aqueles relacionados à resposta imunológica e inflamatória (Franco, 2010). A família do NF- κ B (ou família Rel) consiste de cinco subunidades que incluem P65 (RelA), c-Rel, RelB, P50 (NFKB1) e P52 (Xiao, 2004). Para que haja ativação de NF- κ B, I κ B é fosforilada pela proteína quinase IKK levando a liberação dos dímeros de NF- κ B, os quais migram para o núcleo e regulam a transcrição de genes relacionados à inflamação (Kaltschmidt et al., 2005). Esta via é ativada por uma variedade de sinais pró-inflamatórios, incluindo citocinas e endotoxinas bacterianas (Glezer et al., 2000; Xiao, 2004; Kaltschmidt et al., 2005).

Um grande número de citocinas pró-reabsortivas como TNF- α e IL-1, modula este sistema inicialmente pela estimulação da produção CSF e pelo aumento direto na expressão de RANKL pelos osteoblastos. A expressão de RNA mensageiro (RNAm) para RANKL em osteoblastos é estimulada por alguns fatores de reabsorção óssea, tais como LPS, vitamina D3, IL-1, IL-6, IL-11, TNF- α e prostaglandinas (Ducy et al., 2000; Kobayashi et al., 2000; Kikuchi et al., 2001; Steeve et al., 2004; Lerner, 2004; Tay et al., 2004; Leibbrandt e Penninger, 2008; Trouvin e Goeb, 2010).

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que as prostaglandinas e o sistema RANK/RANKL/OPG são essenciais para a osteoclastogênese e para o metabolismo ósseo e, portanto, importantes alvos moleculares para o diagnóstico e intervenção terapêutica (Hofbauer e Heufelder, 2001; Boyle et al., 2003; Lerner, 2004; Fracon et al., 2008; Leibbrandt e Penninger, 2008; Blackwell et al., 2010; Trouvin e Goeb, 2010).

PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a expressão do RNA mensageiro (RNAm) para as enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico, ciclooxigenase-2 (COX-2) e 5-lipoxigenase, e para os mediadores da osteoclastogênese (RANK, RANKL e OPG) no tecido ósseo, após inoculação de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) nos canais radiculares de molares de camundongos. Posteriormente foi investigado o efeito do bloqueio farmacológico da via COX-2 induzida pelo LPS na expressão de mediadores da osteoclastogênese e de genes envolvidos no metabolismo ósseo.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Após aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP), protocolo nº 10.1.1618.53.0, foram adquiridos 144 camundongos (*Mus musculus*) C57BL/6, machos, com 6 semanas de idade, pesando de 18 a 20 gramas, provenientes do Biotério Central da USP. Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto para ambientação por 7 dias, previamente à realização dos experimentos. Durante todo o período experimental os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno e tampas de aço inoxidável perfurado, de 15 × 20 cm (6 animais por gaiola), forradas com maravalha autoclavada, em temperatura de 22° C e umidade relativa do ar (55 ± 10%) constantes, em um ciclo de claro-escuro de 12 : 12 horas, com dieta padrão de laboratório e livre acesso à água filtrada.

Foram utilizados os primeiros molares superiores (direito e esquerdo) e primeiros molares inferiores (direito e esquerdo) de cada animal, sendo o lado direito sempre utilizado para inoculação de LPS nos canais radiculares e o lado esquerdo utilizado como controle.

Procedimentos Operatórios

Para a realização dos procedimentos operatórios os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (150 mg/kg; Ketamina 10%; Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP) e xilazina (7,5 mg/kg; Dopaser, Laboratórios Calier S/A, Barcelona, Espanha), por via intramuscular na coxa traseira.

Inoculação de lipopolissacarídeo bacteriano nos canais radiculares

Para a realização da primeira etapa experimental foram utilizados 72 camundongos C57BL/6, os quais foram posicionados em uma mesa cirúrgica com dispositivo para retração mandibular, permitindo a imobilização dos animais e manutenção da boca aberta, para acesso aos molares. A abertura coronária foi realizada pela face oclusal, utilizando uma ponta diamantada esférica tamanho ¼

(KG Sorensen Ind. Com. Ltda., Barueri, Brasil). A seguir, os canais radiculares foram localizados por meio de uma lima tipo K número 06 (Les Fils d'Auguste Maillefer S/A, Ballaigues, Suíça) e a polpa radicular removida. Os canais radiculares foram inoculados com uma suspensão de lipopolissacarídeo bacteriano de *Escherichia coli* 0127:B8 (L3129; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, EUA), resuspenso em solução salina, em diferentes concentrações (0,1 mg/ml – Grupo 1, 1 mg/ml – Grupo 2, ou 10 mg/ml – Grupo 3). Em cada dente foram inoculados 10 µL da suspensão, por meio de uma micropipeta automática e os canais radiculares foram selados com cimento de ionômero de vidro convencional (S.S. White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, Brasil), manipulado de acordo com as instruções do fabricante. Dentes hígidos, sem exposição pulpar, foram utilizados como controle (Grupo 4). Cada grupo foi subdividido em 4 subgrupos experimentais (n= 6 camundongos; n=12 dentes), de acordo com o período de avaliação, aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação de LPS nos canais radiculares.

Tratamento com inibidor farmacológico após inoculação de LPS nos canais radiculares

Para a realização da segunda etapa experimental, foram utilizados 72 camundongos C57BL/6. A inoculação de LPS nos canais radiculares foi realizada como descrito previamente, utilizando a concentração de LPS de 1,0 mg/ml. Para inibição farmacológica da via das ciclooxygenases foi utilizada a Indometacina ($C_{19}H_{16}ClNO_4$; Cayman Chemical, Ann Arbor, EUA), por via intraperitoneal, aplicada uma hora antes da inoculação de LPS nos canais radiculares e diariamente durante todo o período de experimentação. Para preparo da solução, a Indometacina foi pesada e diluída em 5% de $NaHCO_3$ em solução salina. Foram utilizadas para experimentação 2 concentrações de Indometacina: 5 mg/kg de peso (Grupos 1 e 2) e 10 mg/kg de peso (Grupos 3 e 4). Os primeiros molares superiores (direito e esquerdo) e primeiros molares inferiores (direito e esquerdo) de cada animal foram utilizados para experimentação, sendo o lado direito sempre utilizado para inoculação de LPS nos canais radiculares (Grupos 1 e 3) e o lado esquerdo utilizado como controle (Grupos 2 e 4). Em animais que receberam injeção diária de solução salina sem Indometacina, dentes hígidos, sem exposição pulpar, foram utilizados como controle negativo (Grupo 5) e dentes inoculados com LPS foram utilizados como controle positivo (Grupo 6). Cada grupo foi subdividido em 4 subgrupos

experimentais (n= 6 camundongos; n=12 dentes), de acordo com o período de avaliação, aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação de LPS nos canais radiculares.

Eutanásia

Decorridos os períodos experimentais determinados, os animais foram submetidos à eutanásia por sobredose anestésica, via intramuscular, com a utilização de Ketamina a 10% (300 mg/kg) e Xilazina (30 mg/kg). Os tecidos foram removidos com auxílio de tesoura e reduzidos em blocos contendo dente e osso. A seguir foram acondicionados em tubos de 1,5 ml esterilizados e livres de RNase (Axygen Inc., Union City, EUA) e imersos em gelo seco, previamente ao congelamento a -20°C.

Extração de RNA total

Para extração de RNA total foi utilizado um *pool* contendo 3 dentes molares, com peso total médio de 30 mg, por meio do RNeasy Mini kit, um protocolo de extração à base de tiocianato de guanidina (RNeasy® Mini, Qiagen Inc., Valencia, EUA). Os blocos contendo dente e osso foram macerados com auxílio de pinça hemostática, em tubo de 1,5 ml esterilizado e livre de RNase (Axygen Inc.), contendo 594 µl de solução tampão RLT e 6 µL de beta-mercaptoetanol (βME). Com a finalidade de lisar e homogeneizar as amostras, os tubos foram agitados em vórtex (IKA® MS3 Basic, IKA® Works Inc., Wilmington, EUA) por 1 minuto e, a seguir, submetidos ao ultrassom por 15 minutos (Unique Ind. e Com. Equipamentos Eletrônicos, Indaiatuba, Brasil). A seguir os tubos foram centrifugados em microcentrífuga (Microcentrífuga modelo 5417R; Eppendorf AG, Hamburg, Germany), a 10.000 rpm, por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 1 volume de etanol a 70%, preparado com água livre de RNase, com a finalidade de fornecer condição apropriada para ligação do RNA à coluna de purificação. A seguir 600 µl da solução foram transferidos para uma coluna contendo um tubo coletor acoplado e os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 15 segundos. O filtrado foi descartado e os 600 µl restantes da solução foram transferidos para a coluna e centrifugados novamente. O filtrado foi descartado, 350 µL da solução tampão RWU foram adicionados à coluna e os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 15 segundos. A seguir 10 µL de DNase I foram diluídos em 70 µL de solução tampão RDD (RNase-Free DNase Set; Qiagen

Inc.), o volume total foi adicionado à membrana presente na coluna e as colunas foram incubadas a 25°C, por 15 minutos, para eliminar a possível contaminação com DNA genômico. A seguir 350 µL da solução tampão RWU foram adicionados à coluna e os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 15 segundos. Posteriormente 500 µL de solução tampão RPE contendo etanol foram adicionados à coluna e os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 15 segundos. Novamente 500 µL de solução tampão RPE contendo etanol foram adicionados à coluna e os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 2 minutos. Com a finalidade de eliminar a possibilidade de carregar remanescentes de solução tampão RPE contendo etanol para as etapas seguintes, o tubo coletor foi descartado, um novo tubo coletor foi inserido na coluna e os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm, por 1 minuto. O tubo coletor foi descartado, um tubo de 1,5 ml foi acoplado à coluna e o RNA presente na membrana foi eluído em 35 µL de água livre de RNase.

A qualidade do RNA total foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% (Sigma-Aldrich Corp.) contendo brometo de etídeo (Sigma-Aldrich Corp.), utilizando tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) concentrado 1×. Foram analisadas as duas bandas correspondentes ao RNA ribossomal 28S e 18S e o RNA foi considerado de boa qualidade quando a relação 28S/18S era igual ou maior que 2. A quantidade de RNA total foi analisada utilizando espectrofotometria em NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA), nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm.

Transcrição reversa e reação da polimerase em cadeia em tempo real (qRT-PCR)

Para as reações de qRT-PCR pelo sistema TaqMan[®], o cDNA foi sintetizado por meio de uma reação de transcrição reversa, a partir de 500 ng de RNA total, utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Em um tubo de 0,2 ml (Axygen Inc.), o RNA foi incubado com 2,0 µL de solução tampão 10×, 0,8 µL de dNTP *mixture* 25× (100mM), 2,0 µL de *random primers* 10×, 1,0 µL da enzima *Multiscribe*[™] Reverse Transcriptase (50 U/ µL), 1,0 µL de inibidor de RNase e acrescido de água livre de RNase para um volume final de 20 µL. As amostras foram incubadas a 25°C por 10 minutos para ligação do *primer* ao RNA, seguido por incubação a 37°C por 2 horas para transcrição reversa e

posterior incubação a 85°C por 5 segundos para inativação da enzima e finalização do processo. O cDNA resultante foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

Para as reações de qRT-PCR, alíquotas de 2 µl (50 ng) de cDNA foram adicionadas a 10,0 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2×, 1,0 µL de TaqMan Gene Expression Assay 20× (par de *primers* + sonda) e acrescido de água livre de RNase para um volume final de 20 µL / poço. *Primers* e sondas para *PTGS2* (Mm00478374), *ALOX5* (Mm01182747), *TNFRSF11A* (Mm00437135), *TNFSF11* (Mm00441906) e *TNFRSF11B* (Mm01205928) foram obtidos comercialmente e são propriedades privadas, portanto as sequências não estão disponíveis (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems). O gene *housekeeping* para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*; Mm99999915) foi utilizado como um controle interno. Para o sistema TaqMan®, foram utilizados *primers* na concentração final de 900 nM cada e sonda MGB (*Minor Groove Binding*) na concentração final de 250 nM. Neste sistema, o fluoróforo 6-FAM é utilizado como repórter, o qual é liberado após clivagem pela polimerase com atividade exonuclease 5'. Para as reações de qRT-PCR foram realizados três experimentos independentes, em duplicata, utilizando o Eppendorf Mastercycler® ep Realplex (Eppendorf AG).

A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: ativação da polimerase AmpliTaq Gold Enzyme a 95 °C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação do DNA e 60°C por 1 minuto para anelamento do *primer* e polimerização. Os resultados foram analisados com base no valor do ciclo limiar (*Ct*, *cicle threshold*), sendo este o ponto correspondente ao número do ciclo no qual a amplificação das amostras atinge um limiar. Este limiar é determinado entre o grau de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras que permite a análise quantitativa da expressão do gene avaliado. Como controle negativo foi utilizada água destilada deionizada, submetida à reação com cada par das sequências dos *primers* e sondas utilizados.

Para normalizar os valores de *Ct*, de forma a considerar diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, o *Ct* determinado para uma amostra foi subtraído do *Ct* do gene constitutivo (*GAPDH*) da mesma amostra, gerando assim o ΔCt . Para cada gene, o cálculo de expressão relativa foi realizado a partir da diferença entre o ΔCt das amostras e o ΔCt apresentado pelo controle ($\Delta\Delta Ct$), com base na equação abaixo:

$$\text{Expressão relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Os valores de expressão relativa de cada RNAm, para cada grupo, foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni ou por ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$).

Transcrição reversa e qRT-PCR Array

A análise global da expressão de RNAm para proteínas envolvidas no metabolismo ósseo foi realizada por meio de um ensaio de qRT-PCR *PCR Array* (Osteogenesis RT² Profiler PCR Array, PAMM-026; Qiagen Inc.). Esta técnica utiliza as vantagens do qRT-PCR combinada com a técnica de *microarray* que permite detectar a expressão de diferentes genes simultaneamente.

Para esta técnica, o cDNA foi sintetizado por meio de uma reação de transcrição reversa, a partir de 200 ng de RNA total, utilizando o kit RT² First Strand (Qiagen Inc.). Em um tubo de 0,2ml, o RNA foi incubado com 6,0 μ L de solução tampão GE2 e acrescido de água livre de RNase para um volume final de 14 μ L. Os tubos foram mantidos ao abrigo da luz, a 25°C, por 10 minutos e, a seguir, foram adicionados 6 μ L da *Reverse Transcriptase Mixture* BC4. Os tubos foram centrifugados e incubados a 42°C por 15 minutos para ligação do *primer* ao RNA e transcrição reversa, seguido por incubação a 95°C por 5 minutos para inativação da enzima e, posteriormente, mantidos a 4°C. Ao cDNA resultante foi adicionado 91 μ L de água livre de RNase para um volume final de 111 μ L, o qual foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

Para este estudo o PCR array foi composto por 84 genes, os quais foram agrupados de acordo com sua função, em fatores de crescimento e diferenciação celular, constituintes estruturais da matriz extracelular (proteínas colagênicas e não-colagênicas), moléculas de adesão celular e fatores de transcrição. Os genes constitutivos *GUSB*, *HPRT*, *HSP90AB1*, *ACTB* e *GAPDH* foram utilizados como controles internos. Foram incluídos em cada placa controles para detecção de contaminação por DNA genômico de camundongos (MGDC), controles para testar a eficiência da reação de transcrição reversa (RTC) e o controles positivos (PPC) que consistem em uma sequência de DNA artificial passível de ser detectada durante a reação (Tabela 1).

Para cada amostra, 102 μ L de cDNA foram adicionados a 1350 μ L de RT² SYBR Green Master Mix 2 $\times$ e acrescido de água livre de RNase para um volume final de 2700 μ L. Desta solução, 25 μ L foram depositados em cada poço, o qual continha cada par de *primers* do PCR Array. Para as reações de qRT-PCR foram realizados dois experimentos independentes, em duplicata, utilizando o Eppendorf Mastercycler[®] ep Realplex (Eppendorf AG).

Para a reação de qRT-PCR foi utilizada a tecnologia SYBR Green, na qual o número de cópias amplificadas de um determinado gene é proporcional à fluorescência quantificada pelo equipamento, oriunda da liberação de fluorocromo. Este fluorocromo encontra-se ligado à dupla fita formada pela associação de uma sonda específica e o cDNA na região do gene de interesse.

A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: ativação da polimerase HotStart DNA Taq Polymerase a 95 °C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos para desnaturação do DNA e 60 °C por 1 minuto para anelamento do *primer* e polimerização. Ao final da reação, foi avaliada a curva de dissociação (*Melting curve*) para determinação da especificidade dos *primers* considerando a temperatura de fusão dos *amplicons*, sob as seguintes condições: aumento da temperatura a 95 °C por 15 segundos, seguido por diminuição da temperatura a 60°C por 15 segundos, aumento gradual da temperatura até 95°C por 20 minutos e manutenção a 95°C por 15 minutos.

Os resultados foram analisados com base no valor de cada Ct, para cada RNAm. Para normalizar os valores de Ct, de forma a considerar diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, o Ct determinado para uma amostra foi subtraído da média geométrica dos Cts dos genes constitutivos (*GUSB*, *HPRT*, *HSP90AB1*, *ACTB* e *GAPDH*) da mesma amostra, gerando assim o Δ Ct. Para cada gene, o cálculo de expressão relativa foi realizado a partir da diferença entre o Δ Ct das amostras e o Δ Ct apresentado pelo controle ($\Delta\Delta$ Ct), com base na equação descrita previamente.

Os grupos foram comparados entre si por meio dos valores de expressão relativa para cada RNAm.

Tabela 1. Genes avaliados no PCR Array para proteínas envolvidas no metabolismo ósseo (Osteogenesis RT² Profiler PCR Array)

GeneBank	Símbolo	Nomenclatura	GeneBank	Símbolo	Nomenclatura
NM_013465	AHSG	Alfa-2-HS-Glicoproteína	NM_010512	IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
NM_007431	ALPL	Fosfatase alcalina	NM_010513	IGF1R	Receptor para o fator de crescimento semelhante à insulina 1
NM_009664	AMBN	Ameloblastina	NM_008396	ITGA2	Integrina alfa 2
NM_009673	ANXA5	Anexina A5	NM_010575	ITGA2B	Integrina alfa 2b
NM_007542	BGN	Biglicano	NM_013565	ITGA3	Integrina alfa 3
NM_009755	BMP1	Proteína óssea morfogenética 1	NM_008401	ITGAM	Integrina alfa M
NM_007553	BMP2	Proteína óssea morfogenética 2	NM_008402	ITGAV	Integrina alfa V
NM_173404	BMP3	Proteína óssea morfogenética 3	NM_010578	ITGB1	Integrina beta 1 (Receptor para fibronectina)
NM_007554	BMP4	Proteína óssea morfogenética 4	NM_008610	MMP2	Metalopectidase da matriz 2
NM_007555	BMP5	Proteína óssea morfogenética 5	NM_008611	MMP8	Metalopectidase da matriz 8
NM_007556	BMP6	Proteína óssea morfogenética 6	NM_013599	MMP9	Metalopectidase da matriz 9
NM_009758	BMPR1A	Receptor para proteína óssea morfogenética, tipo 1A	NM_019471	MMP10	Metalopectidase da matriz 10
NM_007560	BMPR1B	Receptor para proteína óssea morfogenética, tipo 1B	NM_010835	MSX1	Osterix
NM_007643	CD36	CD36	NM_008689	NFKB1	Fator de transcrição nuclear kappa B, p105
NM_009866	CDH11	Caderina 11	NM_008808	PDGFA	Fator de crescimento derivado de plaquetas, alfa
NM_009925	COL10A1	Colágeno, tipo X, alfa 1	NM_011077	PHEX	Endopeptidase reguladora de fosfato, PHEX
NM_007729	COL11A1	Colágeno, tipo XI, alfa 1	NM_009820	RUNX2	Fator de transcrição relacionado ao Runt-2
NM_007730	COL12A1	Colágeno, tipo XII, alfa 1	NM_016741	SCARB1	Receptor scavenger, classe B, tipo 1
NM_181277	COL14A1	Colágeno, tipo XIV, alfa 1	NM_009825	SERPINH1	Inibidor de peptidase serínica, clade H, membro 1
NM_007742	COL1A1	Colágeno, tipo I, alfa 1	NM_008539	SMAD1	SMAD 1
NM_007743	COL1A2	Colágeno, tipo I, alfa 2	NM_010754	SMAD2	SMAD 2
NM_031163	COL2A1	Colágeno, tipo II, alfa 1	NM_016769	SMAD3	SMAD 3
NM_009930	COL3A1	Colágeno, tipo III, alfa 1	NM_008540	SMAD4	SMAD 4
NM_009931	COL4A1	Colágeno, tipo IV, alfa 1	NM_024449	SOST	Esclerostina
NM_009932	COL4A2	Colágeno, tipo IV, alfa 2	NM_011448	SOX9	Fator de transcrição SOX-9
NM_015734	COL5A1	Colágeno, tipo V, alfa 1	NM_018783	TFIP11	Proteína que interagem com Tuftelina-11
NM_009933	COL6A1	Colágeno, tipo VI, alfa 1	NM_011577	TGFB1	Fator de crescimento transformador, beta 1
NM_146007	COL6A2	Colágeno, tipo VI, alfa 2	NM_009367	TGFB2	Fator de crescimento transformador, beta 2
NM_007738	COL7A1	Colágeno, tipo VII, alfa 1	NM_009368	TGFB3	Fator de crescimento transformador, beta 3
NM_016685	COMP	Proteína oligomérica da matriz cartilaginosa	NM_009370	TGFBF1	Receptor para o fator de crescimento transformador, beta 1
NM_009969	CSF2	Fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos 2	NM_009371	TGFBF2	Receptor para o fator de crescimento transformador, beta 2
NM_009971	CSF3	Fator estimulador de colônia de granulócitos 3	NM_011578	TGFBF3	Receptor para o fator de crescimento transformador, beta 3
NM_007802	CTSK	Catepsina K	NM_013693	TNF	Fator de necrose tumoral
NM_016779	DMP1	Proteína da matriz dentinária 1	NM_011656	TUFT1	Tuftelina 1
NM_010113	EGF	Fator de crescimento epidermal	NM_011658	TWIST1	Fator de transcrição Twist-1
NM_017468	ENAM	Enamelina	NM_011693	VCAM1	Molécula de adesão celular vascular-1
NM_010197	FGF1	Fator de crescimento de fibroblastos 1	NM_009504	VDR	Receptor para vitamina D
NM_008006	FGF2	Fator de crescimento de fibroblastos 2	NM_009505	VEGFA	Fator de crescimento endotelial vascular A
NM_008007	FGF3	Fator de crescimento de fibroblastos 3	NM_011697	VEGFB	Fator de crescimento endotelial vascular B
NM_010206	FGFR1	Receptor para fator de crescimento de fibroblastos 1	NM_010368	GUSB	Beta-glucuronidase
NM_010207	FGFR2	Receptor para fator de crescimento de fibroblastos 2	NM_013556	HPRT	Hipoxantina guanina fosforibosil transferase
NM_010228	FLT1	Receptor para o fator de crescimento vascular endotelial 1	NM_008302	HSP90AB1	Proteína de choque térmico 90 alfa, classe B membro 1
NM_010233	FN1	Fibronectina 1	NM_008084	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
NM_145741	GDF10	Fator 10 de diferenciação de crescimento	NM_007393	ACTB	Beta-actina
NM_010493	ICAM1	Molécula de adesão intercelular 1			

RESULTADOS

4 RESULTADOS

A inoculação de LPS nos canais radiculares induz a expressão de *PTGS2* e *ALOX5* *in vivo*

Previamente à inoculação de LPS nos canais radiculares, os animais foram pesados, e ao final dos períodos experimentais foi realizada uma nova pesagem para posterior comparação. A inoculação com LPS não influenciou o ganho de peso dos animais, independente da concentração utilizada (Figura 1). As concentrações de 0,1 mg/ml e 1,0 mg/ml não influenciaram a sobrevivência dos animais durante todo o período experimental, enquanto a concentração de 10 mg/ml ocasionou a morte de cerca de 30% dos animais ao período final de avaliação (Figura 2). As concentrações de 0,1 mg/ml e 1,0 mg/ml foram selecionadas para utilização em experimentos posteriores.

Figura 1. Representação gráfica do ganho de peso em função de tempo, após inoculação de diferentes concentrações de LPS nos canais radiculares de molares de camundongos, durante o decorrer de todo período experimental.

Figura 2. Representação gráfica da sobrevivência em função de tempo, após inoculação de diferentes concentrações de LPS nos canais radiculares de molares de camundongos, durante o decorrer de todo período experimental. * $p < 0,05$ comparado com o controle.

Aos 7 dias após a inoculação de LPS de *E. coli* nos canais radiculares com houve um aumento gradual da expressão do gene *PTGS2* que codifica a enzima COX-2, atingindo o pico da expressão aos 14 dias. A seguir houve uma redução gradual da expressão desse gene aos 21 e 28 dias até atingir a concentração semelhante à do grupo controle. Esta resposta foi dependente da concentração de LPS utilizada. Baixa expressão do RNAm para COX-2 foi observada no controle (Figura 3).

Figura 3. Expressão relativa do gene *PTGS2*, que codifica a enzima COX-2, aos 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação de LPS nos canais radiculares de dentes de camundongos. # $p < 0,05$ comparação entre diferentes concentrações de LPS no mesmo período de tempo; * $p < 0,05$ comparado com o controle.

Analisando o gráfico referente a expressão do gene *ALOX5*, que codifica a enzima 5-LO, foi observada baixa expressão do RNAm nos tecidos nos quais os canais radiculares não haviam sido inoculados com LPS (controle). Aos 7 dias após a inoculação dos canais radiculares com LPS (*E.coli*) houve um aumento significativo da expressão desse gene, atingindo o pico neste período. A seguir houve uma redução gradual da expressão de *ALOX5* aos 14, 21 e 28 dias até atingir a concentração observada no grupo controle (Figura 4).

Figura 4. Expressão relativa do gene *ALOX5*, que codifica a enzima 5-LO, aos 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação de LPS nos canais radiculares de dentes de camundongos. # $p < 0,05$ comparação entre diferentes concentrações de LPS no mesmo período de tempo; * $p < 0,05$ comparado com o controle.

LPS modula *in vivo* a expressão de genes que codificam os mediadores da osteoclastogênese RANK, RANKL e OPG

A concentração de 1,0 mg/ml de LPS apresentou maior efeito na expressão de genes que codificam enzimas responsáveis pelo metabolismo do ácido araquidônico e, portanto, esta concentração foi selecionada para utilização nos experimentos a seguir.

A expressão do gene *TNFRSF11A*, responsável pela codificação do receptor RANK, aos 7 dias após inoculação de LPS nos canais radiculares foi semelhante à do controle. Aos 14 dias, houve um aumento significativo da expressão gênica, atingindo seu pico. Após 21 dias foi observado um declínio considerável da expressão do RNAm, até atingir a concentração observada no grupo controle (Figura 5).

Figura 5. Expressão relativa do gene *TNFRSF11A*, que codifica o receptor RANK, aos 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação de LPS nos canais radiculares de dentes de camundongos. * $p < 0,05$ comparado com o controle.

A expressão do gene *TNFSF11*, que codifica o mediador solúvel RANKL, aumentou aos 7 dias após inoculação de LPS nos canais radiculares. Aos 14 dias, foi observado o declínio da expressão do RNAm, com posterior aumento no período de 21 dias. Aos 28 dias, a expressão gênica encontrava-se semelhante ao grupo controle.

Figura 6. Expressão relativa do gene *TNFSF11*, que codifica a proteína RANKL, aos 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação de LPS nos canais radiculares de dentes de camundongos. * $p < 0,05$ comparado com o controle.

A expressão do gene *TNFRSF11B*, responsável pela codificação da proteína OPG, se manteve semelhante ao controle aos 7 dias após inoculação de LPS nos canais radiculares, com posterior aumento ao 14º dia, permanecendo elevada até o 21º dia. Aos 28 dias a expressão do RNAm diminuiu até atingir expressão semelhante à do grupo controle.

Figura 7. Expressão relativa do gene *TNFRSF11B*, que codifica a proteína OPG, aos 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação de LPS nos canais radiculares de dentes de camundongos. * $p < 0,05$ comparado com o controle.

Indometacina, um inibidor não seletivo de COX-2, inibe a expressão de RNAm para RANK e RANKL e estimula a expressão de OPG nos períodos iniciais de resposta ao LPS

Previamente à administração intraperitoneal de Indometacina os animais foram pesados, e ao final dos períodos experimentais foi realizada uma nova pesagem para posterior comparação. O tratamento diário com Indometacina não influenciou o ganho de peso dos animais, independente da dosagem utilizada de Indometacina (Figura 8). Entretanto, o tratamento diário com Indometacina influenciou a sobrevivência dos animais. A dose diária de 5 mg/kg ocasionou a morte de cerca de 40% dos animais enquanto a dose diária de 10 mg/kg ocasionou a morte de cerca de 70% dos animais, ao período final de avaliação. O grupo controle, que recebeu solução salina sem Indometacina, apresentou uma mortalidade de cerca de

5% (Figura 9). Portanto, a concentração de 5 mg/kg de peso foi selecionada para utilização em experimentos posteriores.

Figura 8. Representação gráfica do ganho de peso em função de tempo, após administração de diferentes doses diárias de Indometacina nos camundongos, durante o decorrer de todo período experimental.

Figura 9. Representação gráfica da sobrevivência em função de tempo, após administração de diferentes doses diárias de Indometacina nos camundongos, durante o decorrer de todo período experimental. * $p < 0,05$ comparado com o controle.

Após a administração de um inibidor não seletivo para COX-2, a expressão de RNAm para RANK, RANKL e OPG foi avaliada durante intervalos de tempo 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação de LPS nos canais radiculares.

A administração de Indometacina inibiu a expressão do RNAm para RANK aos 14 dias após a inoculação de LPS nos canais radiculares. Aos 21 dias observou-se a ausência de efeito da Indometacina na modulação de *TNFRSF11A* e a reversão da inibição aos 28 dias. A administração de Indometacina, sem inoculação de LPS nos canais radiculares, não modulou a expressão do RNAm para o receptor RANK (Figura 10).

Figura 10. Expressão relativa do gene *TNFRSF11A*, que codifica o receptor RANK, aos 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação de LPS nos canais radiculares de dentes de camundongos, com e sem administração diária de Indometacina. # $p < 0,05$ comparação entre inoculação de LPS e inoculação de LPS + tratamento com Indometacina no mesmo período de tempo; * $p < 0,05$ comparado com o controle.

A administração de Indometacina inibiu a expressão do RNAm para RANKL aos 7 dias após a inoculação de LPS nos canais radiculares, sem modulação da expressão gênica aos 14 dias. Aos 21 dias, o tratamento com Indometacina inibiu novamente a expressão do RNAm para RANK, enquanto aos 28 dias houve reversão do efeito (Figura 11). O grupo controle, sem inoculação de LPS nos canais radiculares e sem administração de Indometacina, apresentou expressão do gene *TNFSF11* semelhante ao grupo sem inoculação de LPS nos canais radiculares e com administração de Indometacina.

Figura 11. Expressão relativa do gene *TNFSF11*, que codifica o mediador solúvel RANKL, aos 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação de LPS nos canais radiculares de dentes de camundongos, com e sem administração diária de Indometacina. # $p < 0,05$ comparação entre inoculação de LPS e inoculação de LPS + tratamento com Indometacina no mesmo período de tempo; * $p < 0,05$ comparado com o controle.

A administração de Indometacina estimulou a expressão do gene *TNFRSF11B*, que codifica a proteína OPG, aos 7 dias após inoculação dos canais radiculares com LPS até o 14º dia, quando não foi observada a modulação gênica. Aos 21 dias houve inibição da expressão do RNAm para OPG até o 28º dia, quando não foi observada a modulação gênica. O grupo controle, sem inoculação de LPS nos canais radiculares e sem administração de Indometacina, apresentou expressão do gene *TNFRSF11B* semelhante ao grupo sem inoculação de LPS nos canais radiculares e com administração de Indometacina (Figura 12).

Figura 12. Expressão relativa do gene *TNFRSF11B*, que codifica a proteína OPG, aos 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação de LPS nos canais radiculares de dentes de camundongos, com e sem administração diária de Indometacina. # $p < 0,05$ comparação entre inoculação de LPS e inoculação de LPS + tratamento com Indometacina no mesmo período de tempo; * $p < 0,05$ comparado com o controle.

O tratamento com Indometacina modula diferencialmente a expressão de genes envolvidos no metabolismo ósseo após inoculação de LPS nos canais radiculares

No período de 7 dias após inoculação de LPS nos canais radiculares de molares de camundongos, dos 84 genes avaliados pelo PCR array de genes relacionados ao metabolismo ósseo (Figuras 13A-18A), 5 genes não foram detectados, dentre eles *AHSG*, *BMP5*, *ENAM*, *FGF3* e *TNF*. Trinta e seis genes foram estimulados em relação ao grupo controle. Destes, o efeito do LPS foi mais notável na expressão do RNAm para *BMP2*, *BGN*, *RUNX2*, *SCARB1* e *VCAM1* seguido pelos genes *ANXA5*, *AMBN*, *BMP3*, *BMPR1B*, *COL1A1*, *COL5A1*, *COL4A2*, *COMP*, *CSF2*, *CSF3*, *FGF2*, *ICAM1*, *IGF1R*, *ITGA2*, *ITGA3*, *ITGAM*, *MMP2*, *MMP9*, *MSX1*, *PDGFA*, *SERPINH1*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SOX9*, *TFIP11*, *TGFB1*, *TGFB2*, *TGFB3*, *TGFBR2*, *TGFBR3* e *VEGFA*. Por outro lado, quando os canais radiculares foram inoculados com LPS e os animais receberam tratamento diário com Indometacina, 31 genes foram consideravelmente mais expressos do que no grupo controle. Dentre os genes mais expressos estão *AMBN*, *ITGAM*, *MSX1* e *VEGFA* seguido por *ANXA5*, *BMP2*, *BMP3*, *BMP6*, *BMPR1B*, *COL10A1*, *COL14A1*, *COMP*, *CSF2*, *CSF3*, *EGF*, *FGF1*, *FGF2*, *ITGA2*, *ITGA2B*, *ITGA3*, *ITGAV*, *MMP10*, *RUNX2*, *SCARB1*, *SMAD1*, *SMAD2*, *SMAD3*, *TFIP11*, *TGFBR1*, *TGFBR3* e *VCAM1*. O tratamento com Indometacina estimulou a expressão de 26 genes com relação à inoculação de LPS sem tratamento com Indometacina, dentre eles *AMBN*, *ANXA5*, *BMP3*, *BMP6*, *COL10A1*, *COL14A1*, *COL4A1*, *COMP*, *EGF*, *FGF1*, *FGF2*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FLT1*, *FN1*, *ITGA2B*, *ITGAM*, *ITGAV*, *MMP10*, *MSX1*, *SMAD1*, *SMAD4*, *TFIP11*, *TGFBR1*, *TWIST1* e *VEGFA*.

Quatro genes não foram modulados pela inoculação de LPS e submetidos ao tratamento com Indometacina quando comparado ao grupo controle, dentre eles *FGFR2*, *FN1*, *SMAD4* e *TGFBR2*.

Interessantemente, após inoculação de LPS nos canais radiculares, 41 genes foram inibidos em relação ao grupo controle, dentre eles *ALPL*, *BMP4*, *BMP6*, *BMPR1A*, *CD36*, *CDH11*, *COL6A1*, *COL6A2*, *COL10A1*, *COL11A1*, *COL12A1*, *COL14A1*, *COL1A2*, *COL2A1*, *COL3A1*, *COL4A1*, *COL7A1*, *CTSK*, *DMP1*, *EGF*, *FGF1*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FLT1*, *FN1*, *GDF10*, *IGF1*, *ITGA2B*, *ITGAV*, *MMP10*, *MMP8*, *NFKB1*, *PHEX*, *SMAD1*, *SMAD4*, *SOST*, *TGFBR1*, *TUFT1*, *TWIST1*, *VDR* e *VEGFB*. Do mesmo modo, quando os tecidos inoculados com LPS e submetidos ao

tratamento com Indometacina, 45 genes apresentaram expressão mais baixa que o grupo controle, dentre eles *ALPL*, *BGN*, *BMP1*, *BMP4*, *BMPR1A*, *CD36*, *CDH11*, *COL11A1*, *COL12A1*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1*, *COL3A1*, *COL4A1*, *COL4A2*, *COL5A1*, *COL6A1*, *COL6A2*, *COL7A1*, *CTSK*, *DMP1*, *FGFR1*, *FLT1*, *GDF10*, *ICAM1*, *IGF1*, *IGF1R*, *ITGB1*, *ITGA2B*, *MMP2*, *MMP8*, *MMP9*, *NFKB1*, *PDGFA*, *PHEX*, *SERPINH1*, *SOST*, *SOX9*, *TGFB1*, *TGFB2*, *TGFB3*, *TUFT1*, *TWIST1*, *VDR* e *VEGFB*. O tratamento com Indometacina inibiu a expressão de 53 genes com relação à inoculação de LPS sem tratamento com Indometacina, dentre eles *ALPL*, *BGN*, *BMP1*, *BMP2*, *BMP4*, *BMPR1A*, *BMPR1B*, *CD36*, *CDH11*, *COL11A1*, *COL12A1*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1*, *COL3A1*, *COL4A2*, *COL5A1*, *COL6A1*, *COL6A2*, *COL7A1*, *CSF2*, *CSF3*, *CTSK*, *DMP1*, *GDF10*, *ICAM1*, *IGF1*, *IGF1R*, *ITGA2*, *ITGA3*, *ITGB1*, *MMP2*, *MMP8*, *MMP9*, *NFKB1*, *PDGFA*, *PHEX*, *RUNX2*, *SCARB1*, *SERPINH1*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SOST*, *SOX9*, *TGFB1*, *TGFB2*, *TGFB3*, *TGFB2*, *TGFB3*, *TUFT1*, *VCAM1*, *VDR* e *VEGFB*.

No período de 14 dias após inoculação de LPS nos canais radiculares de molares de camundongos, dos 84 genes avaliados pelo PCR array de genes relacionados ao metabolismo ósseo (Figuras 13B-18B), 2 genes não foram detectados *BMP5* e *FGFR1*. Cinquenta e três genes foram estimulados em relação ao grupo controle. Destes, o efeito do LPS foi mais notável na expressão do RNAm para *AMBN*, *AHSG*, *IGF1R*, *FLT1* e *VCAM1*, seguido pelos genes *BMP1*, *BMP3*, *BMPR1B*, *CDH11*, *COL7A1*, *CSF2*, *CSF3*, *CTSK*, *ENAM*, *FGF1*, *FGFR2*, *ITGAM*, *MMP10*, *MSX1*, *RUNX2*, *SMAD1*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SOX9*, *TFIP11*, *TGFB2*, *TGFB3*, *TNF*, *VDR*, *VEGFA*, *COL6A2*, *COL6A1*, *COL4A2*, *COL2A1*, *COL1A1*, *COL1A2*, *BMP1*, *BMP4*, *BMPR1A*, *TGFB1*, *TGFB1*, *COL10A1*, *COL11A1*, *BGN*, *DMP1*, *MMP9*, *PHEX*, *SERPINH1*, *CD36*, *COMP*, *FN1*, *NFKB1* e *SMAD2*. Por outro lado, quando os canais radiculares foram inoculados com LPS e os animais receberam tratamento diário com Indometacina, 37 genes foram consideravelmente mais expressos do que no grupo controle. Dentre os genes mais expressos estão *AMBN*, *VCAM1*, *COL7A1*, *COL6A1*, *FLT1*, *BMP4* e *VEGFA* seguido por *BMP3*, *CSF3*, *MSX1*, *RUNX2*, *BMPR1B*, *COL4A2*, *COMP*, *FGF1*, *FGFR2*, *ITGA3*, *ITGAM*, *NFKB1*, *PDGFA*, *SMAD3*, *TFIP11*, *TGFB2*, *TNF*, *TUFT1*, *COL4A1*, *COL4A2*, *BMP1*, *TGFB1*, *ANXA5*, *EGF*, *IGF1R*, *COL2A1*, *COL10A1*, *BGN*, *MMP9* e *CD36*. O tratamento com Indometacina estimulou a expressão de 29 genes com relação à inoculação de LPS sem tratamento com Indometacina, dentre eles *ANXA5*, *BGN*,

BMP3, BMP4, BMPR1B, COL2A1, COL4A1, COL6A1, COL4A2, COL7A1, CSF3, CTSK, EGF, FGF1, FGF2, FGF3, FLT1, GDF10, ICAM1, ITGA2, ITGA3, MSX1, NFKB1, PDGFA, SCARB1, TNF, TUFT1, VEGFA e VEGFB.

Quatorze genes não foram modulados pela inoculação de LPS nos canais radiculares comparado ao grupo controle, dentre eles *MMP2, MMP8, SOST, TUFT1, COL12A1, FGF2, EGF, COL3A1, COL5A1, ITGA3, ITGB1, ITGA2B, SMAD4 e TUFT1*. O tratamento com Indometacina não modulou a expressão de 16 genes com relação à inoculação de LPS sem tratamento com Indometacina, dentre eles *CD36, IGF1, FGF3, COL1A1, ALPL, BGN, CSF2, MMP2, MMP8, MMP10, SOST, COMP, ITGA2B, ITGAM, TWIST1 e VCAM1*.

Interessantemente, após inoculação de LPS nos canais radiculares, 16 genes foram inibidos em relação ao grupo controle, dentre eles *ALPL, ANXA5, BMP2, BMP6, COL14A1, COL4A1, FGF2, FGF3, GDF10, ICAM1, IGF1, ITGA2, ITGAV, TGFB3, TWIST1 e VEGFB*. Do mesmo modo, quando os tecidos foram inoculados com LPS e submetidos ao tratamento com Indometacina, 23 genes apresentaram expressão mais baixa que o grupo controle, dentre eles *ALPL, BMP2, BMP6, BMPR1A, CODH11, COL11A1, COL12A1, COL14A1, COL1A2, COL5A1, COL6A2, FGF3, GDF10, IGF1, ITGAV, PHEX, SCARB1, SERPINH1, SMAD4, SOX9, TGFB3, TGFB3 e TGFB2*. O tratamento com Indometacina inibiu a expressão de 35 genes com relação à inoculação de LPS sem tratamento com Indometacina, dentre eles *AHSG, AMBN, BMP1, BMPR1A, CDH11, COL6A2, COL10A1, COL11A1, COL12A1, COL14A1, COL1A2, COL3A1, COL5A1, CSF2, DMP1, ENAM, FGFR2, FN1, IGF1R, ITGAV, MMP9, PHEX, RUNX2, SERPINH1, SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SOX9, TFIP11, TGFB2, TGFB3, TGFB1, TGFB2 e VDR*.

A**Fatores de crescimento e diferenciação celular****BMPs e TGF β**

7 dias

B**Fatores de crescimento e diferenciação celular****BMPs e TGF β**

14 dias

Figura 13. Expressão relativa de genes que codificam fatores de crescimento e diferenciação celular da superfamília das proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) e do fator de crescimento transformador-beta (TGF- β), aos 7 (**A**) e 14 (**B**) dias após inoculação de LPS nos canais radiculares de dentes de camundongos, com e sem administração diária de Indometacina.

A**Fatores de crescimento e diferenciação celular****Outros fatores de crescimento**

7 dias

B**Fatores de crescimento e diferenciação celular****Outros fatores de crescimento**

14 dias

Figura 14. Expressão relativa de genes que codificam outros fatores de crescimento e diferenciação celular, aos 7 (A) e 14 (B) dias após inoculação de LPS nos canais radiculares de dentes de camundongos, com e sem administração diária de Indometacina.

A **B**

Figura 15. Expressão relativa de genes que codificam proteínas colagênicas da matriz extracelular, aos 7 (A) e 14 (B) dias após inoculação de LPS nos canais radiculares de dentes de camundongos, com e sem administração diária de Indometacina.

A **B**

Figura 16. Expressão relativa de genes que codificam proteínas não colagênicas da matriz extracelular, aos 7 (**A**) e 14 (**B**) dias após inoculação de LPS nos canais radiculares de dentes de camundongos, com e sem administração diária de Indometacina.

A **B**

Figura 17. Expressão relativa de genes que codificam moléculas de adesão celular, aos 7 (**A**) e 14 (**B**) dias após inoculação de LPS nos canais radiculares de dentes de camundongos, com e sem administração diária de Indometacina.

A **B**

Figura 18. Expressão relativa de genes que codificam fatores de transcrição, aos 7 (A) e 14 (B) dias após inoculação de LPS nos canais radiculares de dentes de camundongos, com e sem administração diária de Indometacina.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, a inoculação de LPS nos canais radiculares estimulou a expressão dos genes que codificam as enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico, concomitantemente à modulação da expressão de marcadores da osteoclastogênese e de genes envolvidos no metabolismo ósseo.

O envolvimento de PGs no desenvolvimento da lesão periapical foi demonstrado previamente, após exposição do tecido pulpar ao meio bucal, por períodos de 7, 14, 21 e 28 dias. Os macrófagos foram a principal fonte celular responsável pela síntese de prostaglandina em lesões periapicais. Ainda, numerosos osteoclastos ativos foram observados ao longo da superfície óssea alveolar, sugerindo que PGs produzidas pelos macrófagos poderiam ativar os osteoclastos e contribuir para a atividade reabsortiva nas lesões periapicais (Miyauchi et al., 1996). Neste estudo, foram detectadas elevada expressão de RNAm para o fator estimulador de formação de colônia de monócitos (CSF2), MMP-9, ICAM-1, V-CAM e catepsina k nos períodos iniciais após inoculação de LPS nos canais radiculares de dentes de camundongos sugerindo o recrutamento de monócitos e diferenciação destas células em macrófagos e osteoclastos.

Concentrações significativamente mais elevadas de PGE₂ foram encontrados em lesões agudas quando comparados às lesões crônicas, confirmando o papel das PGs na patogênese de lesões periapicais em humanos (McNicholas et al., 1991; Shimauchi et al., 1997; Alptekin et al., 2005). O aumento da síntese de PGE₂ em dentes com inflamação periapical está relacionado com alterações inflamatórias e catabólicas que ocorrem em lesões periapicais (Martinho et al., 2011) e a diminuição da produção de PGE₂ pode ser considerada um indicativo de remissão da doença (Shimauchi et al., 1997).

No estudo presente, foi observado uma elevada expressão do gene *PTGES2*, que codifica a enzima COX-2, aos 7 e 14 dias após a inoculação de LPS nos canais radiculares. Aos 21 dias houve declínio da expressão desse gene, com expressão semelhante à do controle aos 28 dias. Estes resultados corroboram com os estudos mencionados anteriormente, que mostram síntese aumentada de PGs em períodos iniciais de resposta à contaminação dos canais radiculares.

Após indução de lesão periapical em ratos, durante 5, 10, 15 e 20 dias, foi observado que macrófagos e osteoblastos mostraram marcações positivas para COX-2, aumentando significativamente a sua expressão durante o decorrer do período analisado. Após a administração de um inibidor específico para COX-2, Meloxicam, houve uma diminuição em 43% do grau de reabsorção óssea periapical (Lin et al., 2002).

O papel das prostaglandinas na patogênese da inflamação periapical e perda óssea associada foi avaliado com a utilização de Indometacina, um potente inibidor da enzima COX-2. Vinte e quatro horas antes da exposição pulpar os ratos recebiam 10 mg / kg de Indometacina, via intraperitoneal, continuado diariamente durante 6 semanas. A administração diária de Indometacina resultou em uma quantidade significativamente reduzida de reabsorção óssea periapical (Oguntebi et al., 1989). Os resultados do presente estudo demonstram que a inoculação de LPS nos canais radiculares leva ao aumento de expressão de RANK e RANKL, mediadores importantes da osteoclastogênese. Após administração de Indometacina e inoculação de LPS nos canais radiculares houve inibição da expressão de RANK, RANKL, com aumento da expressão de OPG, sugerindo que a inibição da reabsorção óssea observada em estudo prévio ocorra via modulação desses mediadores de osteoclastogênese pela Indometacina. Nos dois estudos, a via de administração intraperitoneal foi escolhida objetivando o alcance rápido e manutenção da concentração plasmática terapêutica. Entretanto, com o decorrer do tempo, houve morte dos animais após tratamento prolongado com Indometacina, atribuída ao álcool etílico a 95% utilizado como veículo no estudo de Oguntebi et al. (1989). Tendo em vista que o veículo utilizado no presente estudo não era alcóolico e o fenômeno de mortalidade também foi observado nos períodos finais de avaliação, podemos atribuir esse efeito ao uso prolongado de Indometacina.

A administração sistêmica de Dexametasona leva a formação de lesões periapicais com menor extensão em ratos, fato atribuído pelos autores à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias pelo LPS (Metzger et al., 2002). Entretanto é importante considerar que Dexametasona é um importante inibidor da enzima fosfolipase A₂, envolvida na geração do ácido araquidônico. Considerando que nossos resultados mostram que as vias de metabolismo do ácido araquidônico são importantes para a regulação gênica de mediadores da osteoclastogênese, os

resultados obtidos naquele estudo podem ser parcialmente atribuídos à inibição da síntese de mediadores lipídicos.

O uso de Indometacina e Meloxicam, um inibidor seletivo de COX-2, pode reduzir significativamente a perda óssea em um modelo de doença periodontal em ratos (Nyman et al., 1979; Bezerra et al., 2000; Gurgel et al., 2004). Porém, os estômagos dos animais do grupo em que foi utilizada a Indometacina nas concentrações de 1 e 2 mg/kg, apresentaram úlceras e hemorragia diferentemente do grupo que recebeu tratamento com Meloxicam. Dessa maneira, o Meloxicam poderia proporcionar um melhor benefício no tratamento da periodontite humana do que inibidores não seletivos da COX-2, uma vez que apresenta eficácia semelhante e menos danos gástricos que a Indometacina. Em nosso estudo optamos pelo uso da Indometacina devido ao fato de ser uma droga clássica, utilizada em grande parte dos estudos e a mesma utilizada em estudo prévio para avaliação da reabsorção periapical induzida, possibilitando assim a comparação dos resultados obtidos.

Os metabólitos da via 5-LO também podem constituir importantes mediadores da inflamação tecidual e reabsorção óssea (Meghji et al., 1992; Gallwitz et al., 1993), inclusive de pacientes com lesão periapical (Torabinejad et al., 1992). No presente estudo foi observado um aumento da expressão do gene *ALOX5*, que codifica a enzima 5-LO, após inoculação de LPS nos canais radiculares, havendo uma diminuição gradual da expressão desta enzima aos 14, 21 e 28 dias, ainda que a expressão tenha sido maior de que o grupo controle em todos os períodos experimentais.

Pacientes com osteoartrite apresentam alta concentração plasmática de LTB₄ e PGE₂, resultando em um processo inflamatório exacerbado, uma vez que esses mediadores são potentes agentes quimiotáticos, aumentam a permeabilidade vascular e formação de edema. O tratamento com licofelone (inibidor dual de COX-2 e 5-LO), NS-398 (inibidor de COX-2), e BAYX-1005 (inibidor de 5-LO) inibiu a produção endógena de LTB₄ e PGE₂ nesses pacientes, resultando num prognóstico mais favorável da doença (Paredes et al., 2002).

Células mesenquimais e osteoblastos secretam o fator solúvel RANKL, em resposta a estímulos pró-inflamatórios. Esta molécula estimula a osteoclastogênese e a atividade dos osteoclastos quando se liga ao receptor RANK presente na superfície de pré-osteoclastos. A OPG, por sua vez, age como um competidor inibitório, bloqueando a interação RANK-RANKL, inibindo assim a diferenciação

osteoclástica. Assim, a osteoclastogênese é regulada pelo balanço na expressão de RANKL e OPG (Boyle et al., 2003; Lerner, 2004).

A expressão do RNAm para RANK, RANKL, OPG, IL-1 e TNF foi investigada por RT-PCR, em lesões periapicais induzidas em primeiros molares inferiores de ratos, deixados abertos ao meio bucal por 1, 2, 3, 4 e 8 semanas (Kawashima et al., 2007). Duas semanas após a indução da lesão periapical foi observada expressão aumentada de RANKL, com pico de expressão na terceira semana. As cinéticas da expressão de RANK e OPG foram semelhantes a de RANKL, ocorrendo um aumento da razão entre RANKL / OPG na segunda e terceira semana. Concomitante a esse achado, a expressão das citocinas pró-inflamatórias também aumentou nesse estágio, sugerindo o efeito sinérgico do RANKL e das citocinas pró-inflamatórias para a progressão das lesões periapicais. O início do processo de reabsorção óssea nas lesões periapicais associado ao aumento da expressão de RANK, indica a diferenciação de osteoclastos, células que apresentam este receptor de superfície (Sabeti et al., 2005; Vernal et al., 2006; Kawashima et al., 2007).

Por outro lado, a síntese de OPG e IL-10, reguladores negativos de RANKL e de citocinas pró-inflamatórias são rapidamente induzidas como provável mecanismo de defesa para evitar a perda óssea exacerbada (Kawashima et al., 2007). No presente estudo foi observado o aumento da expressão de genes reguladores do anabolismo ósseo em resposta ao LPS, dentre eles *BMP1*, *BMP2*, *COL1A1* e *COL4A2*, os receptores *BMPRII*, *TGFBR1* e *TGFBR3* e os fatores de transcrição *RUNX2*, *SMAD2*, *SMAD3*, *MSX1* e *SOX9*.

Lesões periapicais induzidas em ratos, após exposição dos primeiros molares inferiores ao meio bucal, por um período de 7, 14, 21 e 28 dias, foram caracterizadas por um grande número de osteoclastos e células positivas para RANKL aos 7 dias, atingindo o pico aos 14 dias. Aos 21 dias, o número de osteoclastos e células positivas para RANKL diminuíram drasticamente até atingir marcação e número de osteoclastos semelhantes ao controle negativo aos 28 dias (Zhang e Peng, 2005).

Quando há um desequilíbrio na expressão de RANKL e OPG, como em condições inflamatórias, o resultado é uma atividade osteoclástica exacerbada e consequente reabsorção óssea (Menezes et al., 2006; Baud'huin et al., 2007; Menezes et al., 2008). Entretanto, a expressão aumentada de RANKL em condições inflamatórias nem sempre leva a perda óssea, pois a presença de OPG pode influenciar no processo de reabsorção. O aumento da atividade de RANKL

associado à diminuição da atividade regulatória da OPG, está relacionado com o desenvolvimento da lesão periapical (Menezes et al., 2006; Menezes et al., 2008). A concentração de RANKL e OPG no tecido ósseo determina o potencial osteoclástico local, pois a expressão de RANKL e OPG é coordenada para regular a reabsorção e densidade óssea, por controlar o estado de ativação dos osteoclastos (Boyle et al., 2003; Anandarajah, 2009).

No presente estudo, observamos um aumento na expressão gênica de *TNFSF11* que codifica a proteína RANKL, precocemente aos 7 dias e um aumento na expressão de *TNFRSF11A* que codifica o receptor RANK, aos 14 dias, sugerindo o recrutamento de monócitos e diferenciação de osteoclastos a partir de células progenitoras. O efeito da Indometacina na regulação dos genes *TNFRSF11A* e *TNFSF11* foi evidente nos períodos iniciais de avaliação, resultado em menor expressão de RNAm para RANK e RANKL. Ainda, foi observado que após o uso da Indometacina, em dentes submetidos à inoculação de LPS nos canais radiculares, a expressão do gene *TNFRSF11B* que codifica a proteína OPG, manteve-se elevada nos períodos de 7 e 14 dias, demonstrando o efeito do medicamento na modulação da expressão de marcadores de osteoclastogênese. Outros genes relacionados ao anabolismo ósseo foram estimulados pelo tratamento diário com Indometacina, dentre eles *BMP3*, *BMP4*, *FGF1*, *FGF2*, *COL2A1*, *COL4A1*, *COL4A2*, *COL6A1*, *COL7A1*, *COL10A1* e *COL14A1*, o receptor *BMPRI1B* e o fator de transcrição *MSX1*. Porém, aos 21 e 28 dias, o efeito da Indometacina na regulação gênica foi menos evidente, sugerindo a participação de outras vias responsáveis pelo processo de osteoclastogênese.

Portanto, a intervenção precoce na via COX-2 modula a expressão gênica de RANK, RANKL, OPG e outros genes envolvidos no anabolismo ósseo tornando esta via um alvo terapêutico importante para intervenção precoce em doenças inflamatórias, como lesões periapicais, que culminam com reabsorções ósseas. Entretanto mais estudos são necessários para revelar os componentes e funções da vasta rede de mediadores, relacionados e envolvidos com a evolução da lesão periapical e consequente destruição óssea.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo podemos concluir que:

- ✓ A inoculação de LPS nos canais radiculares de molares de camundongos foi capaz de induzir a expressão dos genes *PTGS2* e *ALOX5*, responsáveis pela codificação das enzimas COX-2 e 5-LO, envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico, concomitantemente à modulação da expressão dos genes *TNFRSF11A*, *TNFSF11* e *TNFRSF11B*, responsáveis pela codificação dos mediadores da osteoclastogênese RANK, RANKL e OPG, respectivamente.
- ✓ A administração de Indometacina, um inibidor não seletivo de COX-2, inibiu a expressão de RNAm para RANK e RANKL e estimulou a expressão de OPG durante os períodos iniciais de resposta à inoculação de LPS nos canais radiculares.
- ✓ A inibição da via COX-2 de metabolismo do ácido araquidônico nos períodos iniciais de resposta à inoculação de LPS nos canais radiculares modulou diferencialmente a expressão de genes envolvidos no catabolismo e anabolismo ósseo, indicando possíveis papéis para os mediadores derivados no ácido araquidônico na regulação do metabolismo ósseo.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Farias AS. *Imunologia celular e molecular*. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier; 2008.

Alptekin NO, Ari H, Haliloglu S, Alptekin T, Serpek B, Ataoglu T. The effect of endodontic therapy on periapical exudate neutrophil elastase and prostaglandin-E2 levels. *J Endod* 2005;31(11):791-5.

Anandarajah AP. Role of RANKL in bone diseases. *Trends Endocrinol Metab* 2009;20(2):88-94.

Back M. Functional characteristics of cysteinyl-leukotriene receptor subtypes. *Life Sci* 2002;71(6):611-22.

Blackwell KA, Raisz LG, Pilbeam CC. Prostaglandins in bone: bad cop, good cop? *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21(5):294-301.

Bar-Shavit Z. The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *J Cell Biochem* 2007;102(5):1130-9.

Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L, Redini F, Heymann D. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. *Cell Mol Life Sci* 2007;64(18):2334-50.

Bezerra MM, de Lima V, Alencar VB, Vieira IB, Brito GA, Ribeiro RA, et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2000;71(6):1009-14.

Boudreau LH, Bertin J, Robichaud PP, Laflamme M, Ouellette RJ, Flamand N, et al. Novel 5-lipoxygenase isoforms affect the biosynthesis of 5-lipoxygenase products. *FASEB J* 2011;25(3):1097-105.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423(6937):337-42.

* Normas internas do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da FORP-USP (2009), de acordo com o International Committee of Medical Journals Editors. Uniform Requirements for manuscripts submitted to Medical Journal, 1997. Disponível em: <http://www.icmje.org>. Acesso em 10 de março de 2012.

Bozza PT, Melo RC, Bandeira-Melo C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther* 2007;113(1):30-49.

Charlier C, Michaux C. Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2003;38(7-8):645-59.

Claria J, Romano M. Pharmacological intervention of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. Impact on inflammation and cancer. *Curr Pharm Des* 2005;11(26):3431-47.

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

Consolaro, A. Inflamação e reparo. 1 ed. Maringá: Editora Dental Press; 2009.

De Rossi A, Rocha LB, Rossi MA. Interferon-gamma, interleukin-10, Intercellular adhesion molecule-1, and chemokine receptor 5, but not interleukin-4, attenuate the development of periapical lesions. *J Endod* 2008;34(1):31-8.

Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 2000;289(5484):1501-4.

Fiorucci S, Meli R, Bucci M, Cirino G. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? *Biochem Pharmacol* 2001;62(11):1433-8.

Fracon RN, Teófilo JM, Satin RB, Lamano T. Prostaglandins and bone: potential risks and benefits related to the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in clinical dentistry. *J Oral Sci* 2008; 50(3):247-52.

Franco DG. Fator de transcrição nuclear kappa B no sistema nervoso central: do fisiológico ao patológico. *Revista da Biologia* 2010; 1(4):35-39.

Gallagher JC. Advances in bone biology and new treatments for bone loss. *Maturitas* 2008;60(1):65-9.

Gallwitz WE, Mundy GR, Lee CH, Qiao M, Roodman GD, Raftery M, et al. 5-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid stimulate isolated osteoclasts to resorb calcified matrices. *J Biol Chem* 1993;268(14):10087-94.

Glezer I, Marcourakis T, Avellar MCW, Gorenstein C, Scavone C. O fator de transcrição NF- κ B nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 2000;22:26-30.

Gonzalez-Periz A, Claria J. New approaches to the modulation of the cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. *Curr Top Med Chem* 2007;7(3):297-309.

Goodman LS, Brunton LL, Chabner B, Knollmann BC. *Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics*. 12th ed. New York: McGraw-Hill; 2011.

Greene ER, Huang S, Serhan CN, Panigrahy D. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 2011;96(1-4):27-36.

Gurgel BC, Duarte PM, Nociti FH, Jr., Sallum EA, Casati MZ, Sallum AW, et al. Impact of an anti-inflammatory therapy and its withdrawal on the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2004;75(12):1613-8.

Haeggstoom JZ, Rinaldo-Matthis A, Wheelock CE, Wetterholm A. Advances in eicosanoid research, novel therapeutic implications. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 May; 396(1):135-139.

Harizi H, Corcuff JB, Gualde N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol Med* 2008; 14(10):461-9.

Hersh EV, Lally ET, Moore PA. Update on cyclooxygenase inhibitors: has a third COX isoform entered the fray? *Curr Med Res Opin* 2005; 21(8):1217-26.

Hikiji H, Takato T, Shimizu T, Ishii S. The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. *Progress in Lipid Research* 2008;47(2):107-26.

Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001;79(5-6):243-53.

Holzhausen M, Marcantonio Jr E, Spolidorio DMP, Spolidorio LC. Efeito do celecoxib sobre a resposta inflamatória em doença periodontal experimental: estudo histológico em ratos. *Periodontia* 2009;19(2):86-92.

Jankovic D, Liu Z, Gause WC. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol* 2001;22(8):450-7.

Jin Q, Cirelli JA, Park CH, Sugai JV, Taba M, Jr., Kostenuik PJ, et al. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. *J Periodontol* 2007;78(7):1300-8.

Kaltschmidt B, Widera D, Kaltschmidt C. Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochim Biophys Acta* 2005;1745(3):287-99.

Kaneko T, Okiji T, Kan L, Suda H, Takagi M. An immunoelectron-microscopic study of class II major histocompatibility complex molecule-expressing macrophages and dendritic cells in experimental rat periapical lesions. *Arch Oral Biol* 2001;46(8):713-20.

Kawashima N, Suzuki N, Yang G, Ohi C, Okuhara S, Nakano-Kawanishi H, et al. Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103(5):707-11.

Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev* 2008;29(2):155-92.

Khanapure SP, Garvey DS, Janero DR, Letts LG. Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. *Curr Top Med Chem* 2007;7(3):311-40.

Kikuchi T, Matsuguchi T, Tsuboi N, Mitani A, Tanaka S, Matsuoka M, et al. Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. *J Immunol* 2001;166(5):3574-9.

Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med* 2000;191(2):275-86.

Lau YS, Sabokbar A, Gibbons CLMH, Giele H, Athanasou N. Phenotypic and molecular studies of giant-cell tumors of bone and soft tissue. *Human pathology* 2005;36(9):945-54.

Lee YL, Liu J, Clarkson BH, Lin CP, Godovikova V, Ritchie HH. Dentin-pulp complex responses to carious lesions. *Caries Res* 2006;40(3):256-64.

Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1143:123-50.

Lerner UH. New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15(2):64-81.

Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J* 2003;36(7):464-71.

Lin SK, Kok SH, Kuo MY, Wang TJ, Wang JT, Yeh FT, et al. Sequential expressions of MMP-1, TIMP-1, IL-6, and COX-2 genes in induced periapical lesions in rats. *Eur J Oral Sci* 2002;110(3):246-53.

Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Antigenicity of primary endodontic infection against macrophages by the levels of PGE(2) production. *J Endod* 2011;37(5):602-7.

Marton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15(3):139-50.

Massoumi R, Sjolander A. The role of leukotriene receptor signaling in inflammation and cancer. *Scientific World Journal* 2007;7:1413-21.

McNicholas S, Torabinejad M, Blankenship J, Bakland L. The concentration of prostaglandin E2 in human periradicular lesions. *J Endod* 1991;17(3):97-100.

Meghji S, Sandy JR, Harvey W, Henderson B, Ali N. Stimulation of bone collagen and non-collagenous protein synthesis by products of 5- and 12-lipoxygenase: determination by use of a simple quantitative assay. *Bone Miner* 1992;18(2):119-32.

Menezes R, Bramante CM, da Silva Paiva KB, Letra A, Carneiro E, et al. Receptor activator NFkappaB-ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102(3):404-9.

Menezes R, Garlet TP, Letra A, Bramante CM, Campanelli AP, Figueira C, et al. Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of the lesions. *J Endod* 2008;34(8):932-8.

Metzger Z, Klein H, Klein A, Tagger M. Periapical lesion development in rats inhibited by dexamethasone. *J Endod* 2002;28(9):643-5.

Miyauchi M, Takata T, Ito H, Ogawa I, Kobayashi J, Nikai H, et al. Immunohistochemical detection of prostaglandins E2, F2 alpha, and 6-keto-prostaglandin F1 alpha in experimentally induced periapical inflammatory lesions in rats. *J Endod* 1996;22(12):635-7.

Nyman S, Schroeder HE, Lindhe J. Suppression of inflammation and bone resorption by indomethacin during experimental periodontitis in dogs. *J Periodontol* 1979;50(9):450-61.

Oguntebi BR, Barker BF, Anderson DM, Sakumura J. The effect of indomethacin on experimental dental periapical lesions in rats. *J Endod* 1989;15(3):117-21.

Paredes Y, Massicotte F, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Laufer S, Lajeunesse D. Study of the role of leukotriene B4 in abnormal function of human subchondral osteoarthritis osteoblasts: effects of cyclooxygenase and/or 5-lipoxygenase inhibition. *Arthritis Rheum* 2002;46(7):1804-12.

Paula-Silva FW, Ghosh A, Silva LA, Kapila YL. TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. *J Dent Res* 2009;88(4):339-44.

Paula-Silva FW, Silva LA, Kapila YL. Matrix metalloproteinase expression in teeth with apical periodontitis is differentially modulated by the modality of root canal treatment. *J Endod* 2010; 36(2):231-7.

Pidgeon GP, Lysaght J, Krishnamoorthy S, Reynolds JV, O'Byrne K, Nie D, et al. Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26(3-4):503-24.

Rådmark O, Samuelsson B. 5-Lipoxygenase: mechanisms of regulation. *Journal of Lipid Research* 2009;50(Supplement):S40-S5.

Radmark O, Samuelsson B. Regulation of the activity of 5-lipoxygenase, a key enzyme in leukotriene biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;396(1):105-10.

Rådmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B. 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends in Biochemical Sciences* 2007;32(7):332-41.

Ricucci D, Bergenholtz G. Histologic features of apical periodontitis in human biopsies. *Endodontic Topics* 2004;8(1):68-87.

Ricucci D, Lin LM, Spangberg LS. Wound healing of apical tissues after root canal therapy: a long-term clinical, radiographic, and histopathologic observation study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108(4):609-21.

Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am* 1992; 267(2):54-61.

Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2010.

Sabeti M, Simon J, Kermani V, Valles Y, Rostein I. Detection of receptor activator of NF-kappa beta ligand in apical periodontitis. *J Endod* 2005;31(1):17-8.

Shimauchi H, Takayama S, Miki Y, Okada H. The change of periapical exudate prostaglandin E2 levels during root canal treatment. *J Endod* 1997;23(12):755-8.

Singh RK, Gupta S, Dastidar S, Ray A. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics. *Pharmacology* 2010;85(6):336-49.

Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2004;15(1):49-60.

Steinhilber D, Fischer AS, Metzner J, Steinbrink SD, Roos J, Ruthardt M, et al. 5-lipoxygenase: underappreciated role of a pro-inflammatory enzyme in tumorigenesis. *Front Pharmacol* 2010;1:143.

Suzuki T, Kumamoto H, Ooya K, Motegi K. Expression of inducible nitric oxide synthase and heat shock proteins in periapical inflammatory lesions. *J Oral Pathol Med* 2002;31(8):488-93.

Tay JY, Bay BH, Yeo JF, Harris M, Meghji S, Dheen ST. Identification of RANKL in osteolytic lesions of the facial skeleton. *J Dent Res* 2004;83(4):349-53.

Thomas MV, Puleo DA. Infection, Inflammation, and Bone Regeneration. *Journal of Dental Research* 2011;90(9):1052-61.

Torabinejad M, Cotti E, Jung T. Concentrations of leukotriene B4 in symptomatic and asymptomatic periapical lesions. *J Endod* 1992;18(5):205-8.

Trouvin AP, Goeb V. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clin Interv Aging* 2010;5:345-54.

Vardar S, Buduneli E, Baylas H, Berdeli AH, Buduneli N, Atilla G. Individual and combined effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor and omega-3 fatty acid on endotoxin-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2005;76(1):99-106.

Vernal R, Dezerega A, Dutzan N, Chaparro A, Leon R, Chandia S, et al. RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. *Oral Dis* 2006;12(3):283-9.

Wang Z, McCauley LK. Osteoclasts and odontoclasts: signaling pathways to development and disease. *Oral Dis* 2011;17(2):129-42.

Wymann MP, Schneider R. Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(2):162-76.

Xiao W. Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription. *Cell Mol Immunol* 2004;1(6):425-35.

Zhang F, Engebretson SP, Morton RS, Cavanaugh PF, Jr., Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. The overexpression of cyclo-oxygenase-2 in chronic periodontitis. *J Am Dent Assoc* 2003;134(7):861-7.

Zhang X, Peng B. Immunolocalization of receptor activator of NF kappa B ligand in rat periapical lesions. *J Endod* 2005;31(8):574-7.

ANEXO

**ANEXO A – Folha de Aprovação do Projeto de Pesquisa Na Comissão de Ética no
Uso de Animais (CEUA)**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 10.1.1618.53.0) intitulado "Avaliação da Participação de Prostaglandinas e Leucotrienos na Lesão Periapical Experimentalmente Induzida", de autoria de **Fernanda Regina Ribeiro Santos** e de **Francisco Wanderely Garcia Paula e Silva**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 02.03.2011.

This is to certify that the work (Protocol number 10.1.1618.53.0), entitled: "Avaliação da Participação de Prostaglandinas e Leucotrienos na Lesão Periapical Experimentalmente Induzida" by **Fernanda Regina Ribeiro Santos** and **Francisco Wanderely Garcia Paula e Silva**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, March 02, 2011

Ribeirão Preto, 11 de março de 2011

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro