

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO DAS LESÕES PERIAPICAIS
INDUZIDAS EM ANIMAIS DEFICIENTES DAS ENZIMAS
I_NOS E DA SUBUNIDADE GP91 DA
NADPH OXIDASE**

MARCELO JOSÉ BARBOSA SILVA

**BELO HORIZONTE
2009**

MARCELO JOSÉ BARBOSA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DAS LESÕES PERIAPICAIS
INDUZIDAS EM ANIMAIS DEFICIENTES DAS ENZIMAS
INOS E DA SUBUNIDADE GP91 DA
NADPH OXIDASE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Imunologia
Orientadora: Prof^a Leda Quercia Vieira
Co-orientador: Prof. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BELO HORIZONTE 2009**

DEDICATÓRIA

A toda a minha família, em especial ao meu pai, são as pessoas mais importante para mim.

AGRADECIMENTOS

A Paulinha, minha esposa e super companheira.

A Prof^a. Leda Quercia Vieira por ter disponibilizado recursos para a realização deste trabalho, pela compreensão, estímulos e conselhos profissionais e científicos.

Ao Prof. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho pelo entusiasmo constante.

Ao Dr. Toshihisa Kawai por todo o apoio e experiência transmitida durante o período em que tive o prazer de trabalhar com ele.

A Prof^a. Rosa Arantes, pelo entusiasmo e contribuição na publicação que foi fundamental para a realização deste trabalho.

A Prof^a. Gerluza pela ajuda durante o processamento histológico das lâminas e pelas orientações sempre bem vindas.

Ao Prof. Antônio Helvécio Totola pelas orientações nas análises dos resultados do *Real Time PCR*.

Ao Prof. Oscar por ter cedido o espaço e equipamento para realização dos experimentos finais.

Ao Prof. Marcelo Calliari pela contribuição na análise morfométrica das lâminas.

A Maria Rosa e Fernanda que ajudaram muito na obtenção dos resultados do *Real Time PCR*.

Aos meus colegas de laboratório, grandes companheiros do dia-a-dia cujas sugestões foram fundamentais para resolução dos problemas que ocorrem durante os experimentos. Pelos momentos de descontração, afinal, nem tudo é só trabalho.

Agradecimentos

Aos meus companheiros do Forsyth, principalmente, Kazu, Mickey, Hany, Cristina e Luciana. Adorei trabalhar com todos vocês!

Aos amigos de Boston que tornaram a nossa vida ainda mais agradável.

A todos os técnicos e funcionários da UFMG.

EPÍGRAFE

“Nada lhe posso dar que já não exista em você mesmo.
Não possa abrir-lhe um mundo de imagens, além daquele que há em sua própria alma.
Nada lhe posso dar a não ser a oportunidade, o impulso e a chave.
Eu o ajudarei a tornar visível o seu próprio mundo, e isso é tudo.”

Hermann Hesse

RESUMO

As lesões periapicais desenvolvem-se como uma resposta do hospedeiro frente às infecções endodônticas. A óxido nítrico sintase (NOS) e a NADPH oxidase são enzimas responsáveis por gerarem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio cuja principal ação, entre muitas, relaciona-se à resistência contra patógenos. Essas enzimas são produzidas por fagócitos e outros tipos celulares. Nesse estudo, avaliaram-se os aspectos imunológicos e histológicos da lesão periapical induzida em camundongos C57BL/6 selvagem, iNOS^{-/-} e PHOX^{-/-}. Os resultados mostraram que os animais deficientes da iNOS expressam elevados níveis IL-1 β , TNF- α , RANK, RANKL e MCP-1 comparado àqueles deficientes da PHOX e o selvagem. A reabsorção óssea apical foi maior nos camundongos iNOS^{-/-} comparados aos outros grupos estudados. Observou-se discreto infiltrado inflamatório nos camundongos selvagens e PHOX^{-/-}, enquanto os camundongos iNOS^{-/-} apresentaram intenso infiltrado mononuclear e polimorfonuclear. Avaliou-se também, a presença de linfócitos T na lesão periapical e na medula óssea adjacente em três tempos operatórios diferentes: 3, 7 e 14 dias após a indução da lesão periapical. Comprovou-se a presença de linfócitos T expressando mRANKL, 3 e 7 dias após o procedimentos operatórios, mas não no 14^o dia. Por sua vez, na medula óssea, linfócitos T mRANKL⁺ foram encontradas em todos os tempos operatórios. Detectaram-se, também, fibroblastos e osteoblastos expressando mRANKL 3 dias após a indução da lesão periapical. Os resultados sugerem que os linfócitos T, fibroblastos e osteoblastos parecem ser as células responsáveis pela expressão de mRANKL e, conseqüentemente, pela diferenciação dos osteoclastos nos primeiros momentos do desenvolvimento da lesão periapical. Ademais, os microrganismos e seus subprodutos presentes nas infecções radiculares dos animais C57BL/6 selvagens e PHOX^{-/-} podem interagir com

receptores da resposta imune inata, induzindo a expressão da iNOS e a produção de NO, que podem controlar o processo infeccioso nos tecidos perirradiculares. As espécies reativas de oxigênio não parecem cumprir um papel importante na resistência contra infecções bacterianas nesse modelo de estudo já que as características imunológicas e histológicas da lesão periapical nos animais deficientes da PHOX são semelhantes ao camundongo C57BL/6.

ABSTRACT

The development of periapical lesions is a consequence of host response against an endodontic infection. The nitric oxide synthase and the NADPH oxidase are responsible for generating reactive oxygen and nitrogen intermediates whose main action, amongst many others, is the resistance against pathogens. Phagocytes and other cellular types can produce these enzymes. The aim of this study was to investigate the immunologic and histological aspects of periapical lesion in C57BL/6 wild-type mice, iNOS^{-/-} and PHOX^{-/-}. The results showed that the iNOS^{-/-} mice expressed high levels of IL-1 β , TNF- α , RANK, RANKL and MCP-1 when compared to those with a deficiency in NADPH oxidase and to the wild-type one. The apical thickening of the periodontal ligament was greater in the iNOS^{-/-} mice when compared with the other groups under study, indicating a greater bone resorption. A mild inflammatory infiltrate was noticed in the wild-type mice, as well as in the PHOX^{-/-} ones, whereas the iNOS^{-/-} mice had an intense mononuclear and polymorphonuclear infiltrate. We also evaluated the presence of T cells in the periapical lesion and in the adjacent bone marrow in three different post-operative stages: 3, 7, and 14 days after the induction of periapical lesion. There were T cells expressing mRANKL on day 3 and 7 after the operative procedures, but not on the 14th day. In turn, mRANKL⁺ T cells were found in the bone marrow in all post-operative times. Fibroblasts and osteoblast expressing mRANKL were also detected 3 days after the periapical lesion induction. These findings suggest that the T cells, osteoblasts and the fibroblasts seem to be the cells responsible for the expression of mRANKL and, therefore, for the mediation of osteoclast differentiation in the earlier stages of the periapical lesion development. Furthermore, the microorganisms and their products present in the root canal infections of the C57BL/6 wild-type mice as well as in

the PHOX^{-/-} animals may interact with receptors of the innate immune response, inducing the expression of iNOS and the production of NO, which may control the infectious process in the periradicular tissues. The reactive oxygen intermediates seem not to play an important role in the resistance against bacterial infections in this model of study since the immunological and histological characteristics of the periapical lesion in PHOX-deficient animals are similar to those found in the C57BL/6 mice.

Keywords: iNOS, NADPH oxidase, periapical lesion, nitric oxide, reactive oxygen intermediates, reactive nitrogen intermediates.

Lista de figuras

FIGURA 1 - Desenho esquemático mostrando a montagem do complexo NADPH oxidase.	31
FIGURA 2 – Representação dos molares de ratos utilizados para a padronização dos cortes.....	41
FIGURA 3 – Corte histológico dos molares de camundongos e ratos apontando as regiões periapical e de furca.....	44
FIGURA 4 – Tecido periodontal de rato mostrando a lesão de furca nos diferentes tempos operatórios.	54
FIGURA 5 – Tecido periodontal de rato tratado com MTA e representação gráfica da contagem do número de células.....	55
FIGURA 6 – Corte histológico da região periapical em molares de camundongo.	58
FIGURA 7 – Análise morfométrica da região periapical.	59
FIGURA 8 - Microfotografias representativas da marcação TRAP em todas as linhagens.	61
FIGURA 9 – Microfotografias representativas da marcação TRAP no tecido periodontal de ratos e a quantificação do número de células TRAP positivas.....	62
FIGURA 10 – Marcação das células RANKL ⁺ /CD3 ⁺ na região periapical e espaço medular do osso alveolar nos camundongos C57BL/6.....	64
FIGURA 11 - Marcação das células RANKL ⁺ /CD3 ⁺ na região periapical e espaço medular do osso alveolar em camundongos C57BL/6.....	65
FIGURA 12 – Representação gráfica do número de células CD3 ⁺ e RANKL ⁺ em camundongos C57BL/6.....	66
FIGURA 13 – Expressão de periostina e mRANKL na região periapical do grupo controle e três dias após a exposição pulpar nos camundongos C57BL/6.	68
FIGURA 14 – Expressão das citocinas na região periapical dos camundongos C57BL/6, iNOS ^{-/-} e PHOX ^{-/-} 14 dias após a exposição pulpar.	70

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores das citocinas. 49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 REABSORÇÃO ÓSSEA PERIAPICAL	15
1.2 AS QUIMIOCINAS NA LESÃO PERIAPICAL.....	19
1.3 ÓXIDO NÍTRICO – VISÃO GERAL.....	22
1.3.1 O óxido nítrico e a resistência contra patógenos.....	23
1.4 ÓXIDO NÍTRICO E REABSORÇÃO ÓSSEA.....	24
1.5 A RELAÇÃO ENTRE O ÓXIDO NÍTRICO E RANKL.....	26
1.6 ÓXIDO NÍTRICO NA LESÃO PERIAPICAL.....	27
1.7 NADPH OXIDASE E A PRODUÇÃO DE ESPÉCIE REATIVA DE OXIGÊNIO.....	30
1.8 AS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	32
2 OBJETIVOS.....	36
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	36
3 METODOLOGIA.....	37
3.1 ANIMAIS	37
3.2 PLANO AMOSTRAL.....	38
3.3 INDUÇÃO DA LESÃO PERIAPICAL.....	38
3.4 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA	40
3.4.1 Avaliação morfométrica da região da furca.....	42
3.4.2 Avaliação morfométrica da região periapical.....	43
3.4.3 Quantificação dos osteoclastos.....	44
3.4.4 Análise estatística.....	44
3.5 MICROSCOPIA CONFOCAL.....	45
3.5.1 Análise quantitativa e estatística	46
3.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	46
3.6.1 Extração do RNA.....	47
3.6.2 Reação de transcrição reversa.....	48
3.6.3 PCR em tempo real.....	49
3.6.4 Análise estatística do RT-PCR.....	51
4 RESULTADOS	52
4.1 RESULTADOS DESCRITIVOS DOS EXPERIMENTOS EM RATOS.....	52
4.1.1 14 dias após a intervenção.....	52
4.1.2 21 dias após a intervenção.....	52
4.1.3 28 dias após a intervenção.....	53
4.1.4 Grupo tratado com MTA 21 dias após a intervenção.....	53
4.1.5 Resultados analíticos.....	53
4.2 LESÕES PERIAPICAIS E PRESENÇA DE OSTEOCLASTOS NA REGIÃO PERIAPICAL DE CAMUNDONGOS C57BL/6, iNOS ^{-/-} E PHOX ^{-/-}	56
4.3 EXPRESSÃO DE MRANKL EM CÉLULAS CD3 ⁺ E PERIOSTINA ⁺ NA LESÃO PERIAPICAL.....	63
4.4 EXPRESSÃO DE CITOCINAS NA LESÃO PERIAPICAL.....	69
5 DISCUSSÃO	71
6 CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXOS.....	99
ANEXO 1	99

1 INTRODUÇÃO

O tecido pulpar é circunscrito por uma cavidade rígida e inextensível de dentina que, em condições normais, não possui uma microbiota residente. No entanto, os microorganismos da cavidade oral podem infectar o tecido pulpar por diferentes vias: através da exposição dos túbulos dentinários causada pela cárie e/ou por restaurações mal-adaptadas, e através da circulação sanguínea (via anacorética) (TAKAHASHI 1998). No momento em que os patógenos conseguem se instalar e agredir esse tecido, alterações imuno-inflamatórias ocorrerão, causando a formação de um edema intrapulpar. Como as paredes de dentina são inextensíveis e o tecido pulpar não apresenta circulação colateral (a origem do suprimento de sangue vem basicamente do forame apical), o edema irá comprimir os vasos sanguíneos da polpa dentária, dificultando a circulação e reduzindo o aporte de oxigênio.

Diante desse cenário, os processos metabólicos pulpares cessam juntamente com a perda da sua estrutura, culminando em necrose. O tecido pulpar necrosado fornecerá, então, livre acesso aos microrganismos da cavidade oral, oferecendo as condições ideais para a formação de colônias bacterianas e de biofilmes microbianos dentro do canal radicular. As endotoxinas bacterianas (lipolissacarídeos, proteoglicanos, enzimas e os produtos metabólicos) e derivados da desintegração pulpar atravessam o forame apical e passam a induzir alterações nos tecidos adjacentes periodontais (NAIR *et al.* 1996). É importante ressaltar que a presença desses microrganismos na lesão periapical é uma exceção, e não uma regra (BLOCK *et al.* 1976). Assim sendo, o desenvolvimento das alterações perirradiculares é consequência do efeito indireto de uma infecção instalada nos sistemas de canais radiculares.

A persistência da microbiota intra-canal induz a formação do granuloma apical. Essa lesão está localizada ao redor do ápice radicular e é formada em resposta aos estímulos nocivos, de baixa intensidade, provenientes do canal radicular (NAIR 2004, NAIR *et al.* 1996). A lesão se inicia por hiperemia e edema no pericementum apical com a infiltração de células inflamatórias crônicas, com muitos macrófagos, plasmócitos, linfócitos B e T, além da presença de células não-inflamatórias como fibroblastos, osteoblastos e células endoteliais (NAIR 2004, NAIR *et al.* 1996, RODINI e LARA 2001). A inflamação e o aumento da vascularização do tecido induzem a reabsorção óssea próximo à área apical, tornando-a radiograficamente visível (MARTON e KISS 1992). O granuloma apical típico é, quase sempre, circundado por uma cápsula fibrosa, com feixes condensados de colágeno adjacente ao osso. A lesão possui um excelente potencial de reparo e se converte em tecido periapical normal ou tecido de cicatrização quando o irritante é removido (DE DEUS 1992).

1.1 Reabsorção óssea periapical

A reabsorção óssea observada nas lesões periapicais ocorre por um desequilíbrio entre a atividade de osteoclastos e osteoblastos. Em modelos animais, particularmente em camundongos e ratos, as lesões periapicais desenvolvem-se rapidamente entre a primeira e a segunda semana (fase aguda), com um predomínio de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , IL-1 β , e TNF- α) e intensa reabsorção óssea periapical, seguida de uma fase crônica, com mudanças no perfil das citocinas ali liberadas (IL-4, IL-10 e IL-13) (STASHENKO *et al.* 1987, STASHENKO *et al.* 1994, STASHENKO *et al.* 1998, DINARELLO 1996).

A IL-1 β é, possivelmente, o mais importante destes mediadores, sendo ativa em concentrações menores que 1 ng/mL (STASHENKO e WANG 1992, LIM *et al.* 1994, SHIMAUCHI *et al.* 1998). Inicialmente, pôde-se observar que esse mediador tem atividade de reabsorção óssea em ossos longos de feto de ratos (DEWHIRST *et al.* 1985). Em seguida, Stashenko *et al.* (1987) demonstraram que a IL-1 β foi capaz de inibir a formação óssea *in vitro* em culturas de osteoblastos. Segundo os autores, essa ação estaria relacionada aos múltiplos efeitos inibitórios provocados pela IL-1 β nos osteoblastos, especificamente devido à inibição da síntese de colágeno, da expressão da fosfatase alcalina e da replicação dessas células.

Alguns anos depois, Shimauchi *et al.* (1992) constataram que a IL-1 β estava presente em lesões periapicais humanas. Nessa pesquisa, analisaram-se exudatos de 29 amostras de lesões periapicais com reabsorção óssea diagnosticada radiograficamente, onde, em 25 casos, foram constatados níveis elevados da IL-1 β . Lim *et al.* (1994) realizaram um trabalho semelhante e observaram que as lesões periapicais sintomáticas apresentavam níveis mais elevados da IL-1 β do que as lesões assintomáticas. Sendo assim, a IL-1 β favorece a reabsorção óssea nas lesões periapicais, inibindo a formação óssea pelos osteoblastos e induzindo a reabsorção óssea pelos osteoclastos.

Verificou-se que há uma correlação positiva entre a produção de IL-1 e os mediadores pró-inflamatórios IL-2, IL-12, TNF- α e IFN- γ (STASHENKO *et al.* 1998). Conforme dito anteriormente, algumas dessas citocinas são encontradas, principalmente, na fase aguda da lesão, momento em que acontece grande reabsorção óssea periapical (KAWASHIMA *et al.* 1996, STASHENKO e YU 1989). Em contrapartida, a produção das citocinas Th2 (IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13) coincide com a fase crônica da lesão (STASHENKO *et al.* 1998). Durante essa fase, a atividade reabsortiva é menor devido à ação dessas citocinas. Por exemplo, as lesões periapicais em camundongos IL-

10^{-/-} se desenvolvem com maior reabsorção óssea quando comparada com o camundongo selvagem. Além disso, nos animais *knockout*, a produção de IL-1 β na lesão periapical foi 10 vezes maior do que no animal selvagem. Isso indica que a IL-10 reduz a reabsorção óssea, inibindo a produção da IL-1 β na lesão periapical (SASAKI *et al.* 2000). Já as citocinas IL-4 e IL-13 são capazes de inibir a reabsorção óssea interferindo na osteoclastogênese, bem como na redução da produção das citocinas Th1 (STASHENKO *et al.* 1998).

Sabe-se que existe uma inter-relação entre a resposta imunológica e o metabolismo ósseo, o que insere a investigação dessa doença dentro do campo da osteoimunologia (KAWASHIMA *et al.* 2007, VERNAL *et al.* 2006b). Esse termo surgiu há aproximadamente uma década e os estudos dedicados a esta ciência têm fornecido mais conhecimento sobre a patogênese da lesão periapical.

O principal mecanismo regulador da atividade de osteoblastos e osteoclastos é mediado pelo Receptor do Fator Nuclear Kappa B (RANK) e o seu ligante (RANKL), que pertencem à superfamília do receptor do Fator de Necrose Tumoral (TNF). O RANKL é expresso por diferentes tipos celulares, tais como fibroblastos, linfócitos, macrófagos e células dendríticas (ANDERSON *et al.* 1997, COCHRAN 2008, JOSIEN *et al.* 2000). Ele pode ser expresso na membrana celular, sendo chamado de RANKL de membrana (mRANKL), que pode ser clivado, tornando-se o RANKL solúvel (sRANKL) (MIZUNO *et al.* 2002, NAKASHIMA *et al.* 2000). Sendo um membro da superfamília dos receptores do TNF, RANK não possui atividade de cinase. Deste modo, para que ocorra a cascata de sinalização causada pela interação de RANKL com o seu receptor RANK, este tem de recrutar fatores associados ao receptor TNF ou TRAFs, sendo o TRAF6 o mais importante deles (INOUE *et al.* 2000, WONG *et al.* 1999). Por sua vez, TRAF6 ativa uma série de mediadores intracelulares que causará a ativação do Fator Nuclear Kappa B

(NF- κ B) e do Fator Nuclear da Ativação de Linfócitos T (NFATc1) (TAKAYANAGI *et al.* 2002). Quando essa via é ativada, pré-osteoclastos se unem, formando osteoclastos.

A osteoprotegerina (OPG) foi descoberta por causa da sua capacidade de inibir a diferenciação dos osteoclastos, *in vivo* e *in vitro*. Por ser um homólogo de RANK, OPG interage com RANKL, impedindo a ligação RANKL-RANK (BOYLE *et al.* 2003). A OPG é um membro da superfamília do receptor do TNF, mas diferentemente dos membros dessa família, não apresenta um domínio transmembrana, indicando que a OPG é secretada como uma proteína solúvel. Ela pode ser sintetizada por células do ligamento periodontal, fibroblastos e osteoblastos (BOYLE *et al.* 2003, LEIBBRANDT e PENNINGER 2008).

O entendimento do sistema OPG/RANKL/RANK tem elucidado questões sobre o metabolismo ósseo, principalmente em relação aos mecanismos envolvidos no desenvolvimento dos osteoclastos e, conseqüentemente, na remodelação óssea (KHOSLA 2001). Sabe-se que a fase inicial da remodelação óssea começa com o recrutamento de precursores dos osteoclastos para o tecido ósseo, seguida pela diferenciação dessas células em osteoclastos que serão ativados pelo contato de célula com célula e por fatores liberados pelos osteoblastos (FULLER *et al.* 1991). Assim, o ciclo de reabsorção começa com a ativação dos osteoclastos pelos fatores hormonais (calcitriol e paratormônio) e mediadores ali liberadas (RANKL, IL-1, IL-6 e IL-11). Após a ativação, essas células liberam enzimas ácidas e hidrolíticas que causam a degradação tanto de componentes minerais quanto de componentes orgânicos. O elevado nível de cálcio extracelular causado pela reabsorção da matriz óssea e por substâncias ali liberadas encerra esse ciclo de reabsorção (HILL 1998). Nesse momento, os osteoclastos sofrem apoptose induzida pelo Fator de Crescimento Transformante Beta (TGF- β) (HUGHES *et al.* 1996).

A próxima etapa é denominada fase de reversão, momento em que células mononucleares da linhagem dos monócitos e macrófagos preparam a superfície para novos osteoblastos iniciarem a formação óssea, produzindo uma glicoproteína na qual os osteoblastos podem se aderir (KHOSLA 2001, FULLER *et al.* 1991). Durante a fase inicial da remodelação óssea, a formação dos osteoclastos é controlada pelo sistema OPG/RANKL/RANK. Isso assegura que os ciclos ocorram de forma sincronizada: um ciclo de reabsorção seguido de um ciclo de formação óssea, mantendo a integridade do sistema esquelético (KHOSLA 2001). Em certas doenças inflamatórias que envolvem o tecido ósseo não existe equilíbrio entre formação e destruição óssea. Sendo assim, pode ocorrer excessiva formação óssea, como na osteopetrose, ou excessiva reabsorção óssea, como ocorre na doença reumatóide, doença periodontal e na lesão periapical (KAWASHIMA *et al.* 2007, LERNER 2006).

1.2 As quimiocinas na lesão periapical

As lesões periapicais são caracterizadas pela migração constante de polimorfonucleares, leucócitos, monócitos, linfócitos, plasmócitos e mastócitos (LIAPATAS *et al.* 2003, NAIR 1997, RODINI e LARA 2001). O recrutamento dessas células durante o processo inflamatório é essencial para controlar a infecção periapical. Tal tarefa é resultado da expressão de moléculas de adesão na superfície vascular de células endoteliais, que foram induzidas por citocinas (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α) e por quimiocinas (MOUGHAL *et al.* 1992).

As quimiocinas são pequenos peptídeos de 8-12 kDa que possuem quatro resíduos de cisteína em posições altamente conservadas. Dependendo da posição das duas primeiras cisteínas próximas ao domínio amino-terminal, elas são enquadradas

dentro de quatro subfamílias: CXC ou alfa, CX3C ou delta, CC ou beta e C ou gama, sendo que o X representa o aminoácido presente na porção amino-terminal (ROSSI e ZLOTNIK 2000).

Existem atualmente mais de 40 quimiocinas e aproximadamente 20 receptores de quimiocinas descritos em humanos (MACKAY 2001). A interação entre as quimiocinas e seus receptores é complexa, visto que muitas se ligam a mais de um receptor e muitos receptores se ligam a mais de uma quimiocina. Sendo assim, é difícil saber o papel individual de cada uma. No entanto, estudos mais detalhados sobre as interações entre as quimiocinas e seus receptores mostraram que elas podem ser classificadas em duas categorias, dependendo de como são produzidas: as quimiocinas constitutivas e as quimiocinas induzidas (BARBOSA 2008).

As quimiocinas constitutivas estão envolvidas na organização do tecido linfóide e no tráfego basal de leucócitos (SALLUSTO e BAGGIOLINI 2008). Em contrapartida, as quimiocinas induzidas ou inflamatórias são produzidas em resposta à infecção e recrutam células efetoras, incluindo monócitos, granulócitos e linfócitos T efetores para o local da entrada do patógeno (MOSER e LOETSCHER 2001). Exemplos dessas quimiocinas incluem CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CCL11/eotaxina, CCL4/MIP-1 β , CCL2/MCP-1 e CxCL10/IP-10. Diversas publicações vêm dando mais atenção às quimiocinas devido à importância desses mediadores no recrutamento de leucócitos, em diferentes modelos de inflamação, incluindo lesões periapicais, doença periodontal, infecção intestinal, reações alérgicas e outras doenças (MENZIES-GOW *et al.* 2002, CHAE *et al.* 2002, GARLET *et al.* 2003).

A produção de quimiocinas na lesão periapical pode ser iniciada por elas próprias, por produtos bacterianos e por citocinas como IL-1, TNF- α e IFN- γ . É interessante notar que produtos liberados da dissolução dos tecidos minerais podem,

também, induzir a liberação dessas citocinas quimiotáticas (SILVA *et al.* 2007). Esses produtos podem ser constituintes da dentina, como sialoproteínas e fosfoproteínas. Essas proteínas podem estimular a liberação de fatores quimiotáticos por osteoblastos *in vitro*. Além disso, elas são capazes de estimular a migração de neutrófilos através da liberação de CXCL1/KC e CXCL2/MIP-2 (SILVA *et al.* 2007). As bactérias gram-negativas, normalmente encontradas em infecções endodônticas, como *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* são capazes de induzir a produção de CXCL8/IL-8 por fibroblastos pulpares e osteoblastos (YANG *et al.* 2003). Outro provável causador da liberação de quimiocinas nas lesões periapicais é o trauma causado pela instrumentação ou a irritação causada pelos agentes irrigatórios e materiais endodônticos (SCHMALZ *et al.* 2000, TUNCER *et al.* 2005).

Em lesões periapicais humanas, Kabashima *et al.* (2001) analisaram e detectaram células positivas para MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β e IP-10. Marton *et al.* (2000) haviam comprovado resultados semelhantes, demonstrando a presença das quimiocinas IL-8, MCP-1 e RANTES em granulomas periapicais humanos. Eles notaram que tipos celulares diferentes podem expressar tanto IL-8 quanto MCP-1. Células de diferentes formas (fusiformes e poligonais), encontradas próximo aos restos epiteliais de Malassez, mostraram forte marcação citoplasmática com o anticorpo anti-IL-8, enquanto células marcadas para o MCP-1 foram encontradas na camada epitelial dos vasos sanguíneos, presentes nos granulomas. Acredita-se que, em lesões periapicais crônicas, as quimiocinas são fatores importantes para o desenvolvimento da lesão, contribuindo para a destruição tecidual local e estimulando a liberação de mediadores inflamatórios.

Já se sabe que o MCP-1 é importante para migração de células mononucleares para a região periapical. Como foi demonstrado por Chae *et al.* (2002), camundongos deficientes dessa quimiocina são susceptíveis à disseminação da infecção endodôntica.

Em lesões periapicais humanas, o MCP-1 também participa do recrutamento de monócitos, sendo expresso, principalmente, por células epiteliais (MARTON *et al.* 2000, KABASHIMA *et al.* 2001). Outros trabalhos já provaram que o MCP-1 é produzido em cistos periapicais, podendo ser responsável pela progressão desse tipo de lesão (SILVA *et al.* 2005). Portanto, MCP-1 está relacionado com o desenvolvimento das lesões perirradiculares.

1.3 Óxido nítrico – visão geral

O óxido nítrico (NO) é um mensageiro intracelular relacionado com a resposta imunológica, além de participar dos mecanismos neuronais e cardiovasculares (NATHAN 1992). Ele é produzido por um grupo de isoenzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS) (BREDT e SNYDER 1990). Três isoformas distintas da NOS já foram identificadas: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e indutível (iNOS) (NATHAN 1992). A eNOS e nNOS são enzimas constitutivas dependentes da interação com o complexo cálcio/calmodulina. Elas podem sintetizar, rapidamente, pequenas quantidades de óxido nítrico, na ordem de 10^{-9} M (CARMIGNANI *et al.* 2000). A iNOS é uma enzima cuja expressão é induzida por mecanismos inflamatórios. Ela pode produzir quantidades de NO na ordem de 10^{-6} M, 1000 vezes maior do que as NOS constitutivas. Nessa concentração, o NO é transformado em outras espécies reativas que são citotóxicas (ALAYAN *et al.* 2006).

1.3.1 O óxido nítrico e a resistência contra patógenos

No que se refere à importância do NO nos mecanismos de resistência contra diferentes patógenos, Assreuy *et al.* (1994) demonstraram que macrófagos estimulados com Zimozan e IFN- γ ou LPS e IFN- γ matam a *Leishmania major* e que a adição de um inibidor da iNOS (N-iminoetil-L-ornitina) impede completamente esse efeito. Os autores ainda comprovaram que o doador de NO, S-nitroso-acetil-penicilina teve grande ação microbicida quando adicionado diretamente sobre o parasita. Desse modo, a morte do parasita realizada pelo macrófago é altamente dependente do óxido nítrico. Para reforçar a importância do NO na suscetibilidade contra a infecção por *Leishmania major*, outros autores deixaram claro que a geração de NO cumpre papel central na produção de IFN- γ pelas células *natural killer* (DIEFENBACH *et al.* 1998).

Em alguns parasitismos, o NO pode ser relevante tanto na fase aguda da doença quanto na fase crônica. Essa importância está bem caracterizada na infecção por *Toxoplasma gondii*, quando o NO parece não ser necessário para a resistência inicial a esse patógeno, uma vez que animais iNOS^{-/-} conseguem inibir o crescimento do parasita. Entretanto, se animais que sofrem dessa infecção crônica forem tratados com inibidores da iNOS, o resultado é a reativação da doença (ALEXANDER *et al.* 1997). Outros trabalhos realizados em animais iNOS^{-/-} comprovaram que essa enzima também é importante na resistência contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. Tais bactérias são a *Prevotella nigrescens*, o *Actinomyces viscosus* e o *Fusobacterium nucleatum* (FUKADA *et al.* 2008). Gyurko *et al.* (2003) demonstraram a importância da produção do NO em modelo de doença periodontal provocada pela *Porphyromonas gingivalis*, em animais iNOS^{-/-}.

1.4 Óxido nítrico e reabsorção óssea

O óxido nítrico produzido pelo próprio organismo ou fornecido por doadores possuem uma ação dicotômica que afeta o recrutamento, proliferação, diferenciação e sobrevivência tanto dos osteoclastos e osteoblastos quanto dos precursores dos osteoclastos. A produção basal ou induzida de baixos níveis de NO favorece a formação dos osteoclastos, enquanto níveis elevados de NO inibem a formação dos mesmos (CHOLE *et al.* 1998, RALSTON *et al.* 1995, RALSTON e GRABOWSKI 1996, VAN'T HOF e RALSTON 2001). Por exemplo, o tratamento das células da calvária de camundongos com doses crescentes de um doador de óxido nítrico (S-nitroso acetilpenicilina) provou que doses mais baixas de NO induzem a formação de osteoclastos, ao passo que doses mais altas a inibiam (RALSTON *et al.* 1995). Complementando o experimento anterior, Ralston e Grabowski (1996) publicaram resultados indicando uma forte associação entre a produção do NO com a reabsorção óssea induzida pelas citocinas IL-1 β e TNF- α . Eles trataram células da calvária de camundongos com IL-1 β e TNF- α e demonstraram que a reabsorção óssea induzida pelas citocinas estava relacionada com a produção de baixos níveis de NO, aproximadamente 15 μ M. No entanto, quando eles realizaram os mesmos experimentos tratando as mesmas células com IFN- γ , observaram que essa citocina inibiu a reabsorção óssea e que essa inibição estava relacionada com a maior produção de NO, em torno de 40 μ M.

O NO tem sido apontado como um mediador importante na ação do estrógeno sobre o bloqueio da reabsorção óssea que ocorre na osteoporose. Em estudos com um modelo de osteoporose por deficiência de estrógeno, ratas ovariectomizadas apresentavam menor densidade óssea e redução no peso do fêmur em relação ao grupo

controle. Esses efeitos foram completamente inibidos pelo tratamento com nitroglicerina (doador de NO) (WIMALAWANSA *et al.* 1996). Complementando esses experimentos, os pesquisadores trataram as ratas com 17-beta-estradiol que, como esperado, inibiu a perda óssea. Porém, na presença de L-Nitro-Arginina Metil Ester (L-NAME), um inibidor da iNOS, esse tratamento não foi efetivo, indicando que a ação protetora do estrógeno contra a perda óssea pode ser mediada pelo óxido nítrico. Outros autores mostraram resultados conflitantes com os anteriores, ao observarem que camundongos ovariectomizados deficientes da iNOS não apresentavam redução na densidade óssea (CUZZOCREA *et al.* 2003). Portanto, o NO exerce efeitos opostos no osteoclasto, podendo tanto inibir sua ativação e diferenciação quanto induzi-las.

Alguns estudos já demonstraram a importância do NO em modelos animais de doenças inflamatórias relacionadas ao tecido ósseo, tais como a artrite reumatóide, doença periodontal e periodontite apical (VEIHELMANN *et al.* 2002, ALAYAN *et al.* 2006, FUKADA *et al.* 2008). Alayan *et al.* (2006) induziram doença periodontal em camundongos iNOS^{-/-} por inoculação oral de *Porphyromonas gingivalis*. Eles mostraram que os camundongos deficientes da iNOS apresentaram duas vezes mais reabsorção óssea do que os camundongos selvagens. Eles avaliaram, também, o infiltrado inflamatório em infecções subcutâneas com *Porphyromonas gingivalis* e observaram que os camundongos deficientes da iNOS possuem um infiltrado de polimorfonucleares maior do que os camundongos selvagens. Fukada *et al.* (2008), por sua vez, obtiveram resultados semelhantes em lesões periapicais induzidas em camundongos iNOS^{-/-}. Esses animais apresentaram maior reabsorção óssea periapical 14 dias após a infecção dos canais radiculares pelas bactérias *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella nigrescens*. Além disso, o número de osteoclastos e a expressão de RANK foram maiores

comparados aos animais selvagens. Deste modo, o óxido nítrico intercede na reabsorção óssea alveolar causada por patógenos da cavidade oral.

1.5 A relação entre o óxido nítrico e RANKL

Os mediadores do sistema esquelético RANKL e OPG não estão envolvidos somente nos mecanismos de diferenciação dos osteoclastos a partir de células progenitoras da medula óssea, mas também na fisiologia e patologia do sistema vascular. Tal envolvimento parece depender da produção do NO pela óxido nítrico sintase (SATTLER *et al.* 2004, BROWNER *et al.* 2001, SCHOPPET *et al.* 2003b, MIN *et al.* 2007).

Alguns trabalhos comprovaram que os níveis sanguíneos de RANKL e OPG estão relacionados com doenças coronarianas. Os níveis de OPG são quatro vezes mais altos em mulheres com risco de doenças cardiovasculares em comparação com mulheres saudáveis (BROWNER *et al.* 2001). Corroborando esses resultados, outros autores encontraram elevados níveis de OPG e baixos níveis de sRANKL em homens com doença coronariana (SCHOPPET *et al.* 2003a, SCHOPPET *et al.* 2003b). Então, já que sRANKL está relacionado com doenças coronarianas, é possível que essa proteína exerça alguma influência na parede dos vasos sanguíneos. Para confirmar essa hipótese, Min *et al.* (2007) demonstraram que RANKL promove a permeabilidade vascular e angiogênese, estimulando a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) por mecanismos dependentes de TRAF-6, PI3K e Akt. Sendo assim, RANKL promove alterações na parede vascular, regulando a produção do óxido nítrico na camada endotelial.

Sabe-se que RANKL induz a produção de NO pelas células pré-osteoclásticas e que essa produção é essencial na diferenciação dos osteoclastos (FAN *et al.*

2004, FUKADA *et al.* 2008). Entretanto, Zheng *et al.* (2006) comprovaram que a produção de NO induzido pelo RANKL exerce uma regulação negativa na diferenciação osteoclástica, uma vez que as células da medula óssea isoladas de camundongos iNOS^{-/-} estimuladas pelo RANKL se diferenciam mais em osteoclastos, quando comparadas às mesmas células isoladas dos camundongos selvagens. Para esclarecer tal fato, eles estimularam células RAW 264.7 com RANKL e mostraram que essas células produzem IFN- β ¹, além de NO. Em seguida, eles trataram células RAW 264.7 durante a sua diferenciação com um anticorpo que neutraliza o IFN- β . Observou-se que a inativação do IFN- β causa uma redução na expressão da iNOS e do NO, aumentando a diferenciação dos osteoclastos. Deste modo, a produção do IFN- β induzido pelo RANKL em células pré-osteoclásticas promove a expressão da iNOS e a geração do NO, sendo um importante sinal de *feedback* negativo durante a osteoclastogênese.

Os resultados acima discutidos mostram que os eventos iniciados pela interação entre RANKL e RANK em vasos sanguíneos e nas células progenitoras dos osteoclastos estão fortemente relacionados com a expressão da iNOS e com a produção do NO.

1.6 Óxido nítrico na lesão periapical

O processo da formação das lesões periapicais está diretamente relacionado com a destruição óssea provocada pelas citocinas IL-1 β e TNF- α , cuja produção é estimulada pela presença de produtos bacterianos oriundos do canal radicular (STASHENKO *et al.* 1987, HONG *et al.* 2004, BAIK *et al.* 2008). Além disso, existe uma forte correlação entre a produção da iNOS e os fatores bacterianos, tais como o LPS e as citocinas pró-

¹ Já se sabe que o IFN- β inibe a osteoclastogênese por interferir na expressão de c-fos induzida pelo RANKL (TAKAYANAGI *et al.* 2002).

inflamatórias (IFN- γ , IL-1 β e TNF- α) (NAIR *et al.* 1996, REDDI *et al.* 1995, KIKKAWA *et al.* 1998, HONG *et al.* 2004, FOUAD e ACOSTA 2001, SUNDQVIST 1992).

Em 1998, Takeichi *et al.* comprovaram que polimorfonucleares (PMN) obtidos a partir de exudatos da lesão periapical em pacientes humanos expressam iNOS e produzem NO. Para constatar se PMN obtidos do sangue periférico dos mesmos pacientes são capazes de produzir NO, essas células foram isoladas e estimuladas com uma mistura de LPS, IL-1 β e IFN- γ . Observou-se que o tratamento dos PMN com a combinação das três substâncias produziu elevados níveis de NO ($224 \pm 26 \mu\text{M}$), quando comparado com LPS e IL-1 β ($90 \pm 32 \mu\text{M}$) ou LPS e IFN- γ ($158 \pm 20 \mu\text{M}$). Resultado semelhante ao encontrado nos PMN foi demonstrado na própria lesão. Eles observaram a co-localização entre PMN produzindo iNOS, com mononucleares produzindo IL-1 β ou IFN- γ . Sendo assim, os PMN podem produzir NO induzido por citocinas liberadas por células mononucleares.

Em 1999, outros autores complementaram os achados anteriores, isolando monócitos do sangue periférico de indivíduos com alterações perirradiculares e os estimulando com LPS de bactérias sabidamente envolvidas nas infecções endodônticas (*Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis*). Eles viram que as células mononucleares produziram elevados níveis de IL-1 β , IL-6 e IL-8 em resposta ao LPS (MATSUSHITA *et al.* 1999). Hong *et al.* (2004) publicaram resultados ainda mais relacionados com a lesão periapical. Eles demonstraram que o LPS induz a reabsorção óssea periapical através da liberação de IL-1 α e TNF- α por macrófagos presentes na lesão. Confirmou-se a capacidade do LPS de induzir reabsorção óssea periapical em um modelo animal de periodontite apical em que ratos tratados com polimixina B (inibidor específico do LPS) apresentaram menor progressão da lesão periapical (80% a menos), quando comparados aos animais não tratados. Isso sugere

que as endotoxinas bacterianas produzidas dentro do canal radicular alcançam a região periapical, induzindo a síntese de IL-1 α e TNF- α pelos macrófagos ali residentes. Ainda mais, essas citocinas aumentam a produção de metaloproteinase 1 (MMP-1) pelos macrófagos, que é essencial para o início da reabsorção óssea (HONG *et al.* 2004).

No entanto, não só macrófagos, mas também osteoblastos podem produzir MMP-1. Lin *et al.* (2003) comprovaram tal fato e ainda o correlacionaram com a produção do NO pelos macrófagos. Eles viram que a indução da expressão da iNOS pelo LPS em macrófagos da linhagem J774 foi capaz de induzir a produção de MMP-1 por osteoblastos *in vitro*. Em contrapartida, os macrófagos que não foram previamente tratados com LPS não produzem NO e, por extensão, não foram capazes de induzir a produção de MMP-1 pelos osteoblastos. Para confirmar se a expressão da MMP-1 estava relacionada com o aumento na expressão da iNOS, os mesmos autores adicionaram à cocultura citrato de L-N^G-mono-metil Arginina (L-NMMA) um inibidor da iNOS, e mostraram que a expressão da MMP-1 foi reduzida em 39% (LIN *et al.* 2003).

Algumas publicações evidenciaram que diferentes tipos celulares expressam a iNOS e produzem óxido nítrico em granulomas periapicais e cistos radiculares humanos (TAKEICHI *et al.* 1998a, TAKEICHI *et al.* 1998b, SUZUKI *et al.* 2002). Suzuki *et al.* (2002) e Takeichi *et al.* (1998) analisaram por imuno-histoquímica diferentes tipos de lesões periapicais, dentre elas granuloma apical, cisto radicular e cisto radicular residual. Eles demonstraram que, na maioria das lesões periapicais, os polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos apresentaram marcação citoplasmática para iNOS. Já nos cistos radiculares e cistos radiculares residuais, além dos macrófagos e linfócitos, as células epiteliais também mostraram marcação positiva para iNOS. Em algumas lesões, eles notaram que a iNOS também pode ser sintetizada por células não-inflamatórias, como o fibroblasto.

1.7 NADPH oxidase e a produção de espécie reativa de oxigênio

A NADPH oxidase (PHOX ou NOX) é um complexo enzimático capaz de reduzir o oxigênio utilizando o NADPH como substrato. Ela é composta por duas cadeias na membrana celular (gp91^{phox} e p22^{phox}), três cadeias citosólicas (p67^{phox}, p47^{phox} e p40^{phox}) e dois peptídeos de baixo peso molecular conhecidos como Rac 1 e Rac 2 (BABIOR 1999). Para que a enzima seja ativada, a cadeia citoplasmática p47^{phox} tem de ser fosforilada, causando uma alteração conformacional na sua estrutura, o que permite a sua ligação à p22^{phox}. O complexo p22^{phox}-p47^{phox} ativa a p67^{phox} que, por sua vez, recruta a p40^{phox} e se une ao complexo de membrana. Por fim, Rac se liga diretamente à gp91^{phox}. Após essa ligação, forma-se um complexo estrutural que é capaz de oxidar o NADPH e reduzir o oxigênio. Para que ocorra essa reação de oxi-redução, o NADPH doa elétrons para o dinucleotídeo flavina-adenina (FAD), que está na estrutura da gp91^{phox}. Em seguida, o FAD reduzido transfere os elétrons para os grupos hemes localizados no complexo de membrana da gp91^{phox} que, então, reduz o oxigênio gerando o radical superóxido (BABIOR 1999, BEDARD e KRAUSE 2007). (FIG. 1)

originar-se-ão outras espécies reativas responsáveis pela ação microbicida desses fagócitos, entre elas: o peróxido de hidrogênio, produzido pela dismutação espontânea ou enzimática do superóxido; o ácido hipocloroso (HOCl), formado a partir da reação do peróxido de hidrogênio com o ânion cloreto (reação catalisada pela mieloperoxidase) e o radical hidroxila (OH[•]), formado a partir da reação do peróxido de hidrogênio com o superóxido (GARDNER e FRIDOVICH 1991,WINTERBOURN e SUTTON 1986,BABIOR 2004).

Estudos recentes revelaram que pequenas quantidades de ROS têm ações completamente distintas daquelas relacionadas à ação microbicida dos fagócitos. Por exemplo, baixas concentrações de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio podem agir como segundo mensageiro em diferentes vias de sinalização (BAE *et al.* 1997,LANDER 1997,RHEE 1999).

1.8 As espécies reativas de oxigênio

A produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) tem grande importância na resistência contra doenças infecciosas (NATHAN e SHILOH 2000). Em animais *gp47^{phox}/-* (modelo animal da granulomatose crônica humana) a suscetibilidade às infecções bacterianas e fúngicas é maior se comparada com a dos animais selvagens (JACKSON *et al.* 1995,HEYWORTH *et al.* 2003). Outros autores relatam o envolvimento das ROS na resistência contra infecções por protozoários como *Leishmania tropica* e *Plasmodium falciparum* (GHOSH *et al.* 2003,UHLEMANN *et al.* 2004).

A produção de ROS pelos osteoclastos e pré-osteoclastos é importante no processo de reabsorção óssea e de diferenciação dos osteoclastos (GARRETT *et al.* 1990) YANG *et al.*, 1998). A ativação da NADPH oxidase na membrana do osteoclasto e a

produção de superóxido parecem estar envolvidas no complexo processo de reabsorção óssea (KEY *et al.* 1990, GARRETT *et al.* 1990). Essa afirmação foi verificada por uma série de experimentos realizados em cultura de calvária de camundongo. Garret *et al.* (1990) demonstraram que existe um aumento da reabsorção óssea em cultura de calvária de camundongo na presença de um sistema de geração de radicais livres (xantina/xantina oxidase). Eles observaram, ainda, que camundongos tratados com xantina e xantina oxidase apresentaram um número maior de osteoclastos e aumento na superfície de reabsorção óssea na calvária. Tais resultados foram semelhantes àqueles obtidos após a injeção de IL-1 α diretamente sobre a calvária. Para confirmar que a reabsorção detectada neste modelo se relacionava à produção de superóxido pelos osteoclastos, aqueles autores estimularam uma cultura de células da calvária com paratormônio e IL-1, e comprovaram esta premissa ao detectarem um aumento na produção do radical superóxido. Ademais, tal reabsorção foi inibida pela superóxido dismutase e catalase, enzimas que consomem rapidamente o superóxido e o peróxido de hidrogênio presentes no tecido (GARRETT *et al.* 1990).

Em outra linha de experimentos, os mesmos autores isolaram osteoclastos de aves, incubaram-nos com citocromo C e mediram sua forma reduzida, que indiretamente afere a quantidade de agentes oxidantes no tecido. Eles comprovaram que tais células podem produzir $10,4 \pm 2$ nmol/poço de citocromo c reduzido. Essa produção foi completamente inibida pela superóxido dismutase. Para visualizar quais células eram responsáveis pela produção de superóxido, Key *et al.* (1990) utilizaram o marcador azul de tetrazolium, e mostraram que os osteoclastos são grandes produtores do radical superóxido.

As espécies reativas de oxigênio participam da sinalização intracelular mediada por RANK. De acordo com Koh *et al.* (2006) e Sasaki *et al.* (2009), RANKL induz a

produção de ROS por células da medula óssea da linhagem dos monócitos. Eles demonstraram que a produção de ROS pela interação RANK-RANKL envolve TRAF6, Rac1 e isoforma 1 da NADPH oxidase, indicando que a produção de ROS é regulada pela sinalização iniciada por RANK-RANKL. Recentemente, publicou-se que a NOX2 é importante durante os processos de diferenciação de células da medula óssea em osteoclastos. Nessa publicação, Sasaki *et al.* (2009) monitoraram a expressão gênica das isoformas 1 à 4 da NADPH oxidase por PCR em tempo real durante a diferenciação das células RAW 264.7 após o tratamento com RANKL. RAW 264.7 apresentaram elevados níveis de mRNA da isoforma 2 e pequenas quantidades de transcritos para as isoformas 1 e 3. O tratamento das células RAW 264.7 por RANKL reduziu, acentuadamente, a expressão da isoforma 2 da NADPH oxidase e aumentou a expressão das isoformas 1 e 3. Para confirmar se tais enzimas seriam importantes na diferenciação dessas células em osteoclastos, a formação dos transcritos das enzimas p67^{phox} ou p22^{phox} foi bloqueada por RNA pequenos de transferência (siRNA). Após a transfecção dos siRNAs nas células RAW 264.7, observou-se uma redução na produção de ROS e inibição na diferenciação osteoclástica induzida por RANKL.

Existem poucas publicações na literatura que relacionam a NADPH oxidase com doenças da cavidade oral. A relação entre a produção de ROS e o desenvolvimento da doença periodontal vem sendo objeto de estudo. Alguns autores evidenciaram que os neutrófilos de pacientes com periodontite crônica e juvenil tornam-se hiper-reativos quando desafiados com *Fusobacterium nucleatum* ou via receptor Fcγ, liberando elevadas quantidades de ROS (MATTHEWS *et al.* 2007, ASMAN e BERGSTROM 1992). Há evidências de que a geração de ROS pela NADPH oxidase pode estar relacionada com a suscetibilidade à doença periodontal em pacientes diabéticos. Pesquisadores sugeriram que uma das razões da susceptibilidade dos pacientes diabéticos à doença periodontal

seria a maior produção de ROS pelos neutrófilos devido ao aumento na fosforilação da p47^{phox} e sua translocação para a membrana (KARIMA *et al.* 2005). Gyurko *et al.* (2006), utilizando um modelo animal de hiperglicemia crônica, demonstraram por microscopia intravital que o número de leucócitos aderidos ao endotélio dos vasos sanguíneos do ligamento periodontal estavam aumentados. Estes autores sugerem que a hiperglicemia crônica induz a marginalização dos leucócitos e a produção de superóxido, mas não a transmigração.

Diante do exposto, percebe-se que o óxido nítrico e as espécies reativas de oxigênio têm grande participação nas doenças da cavidade oral. Além de ser peça-chave nos mecanismos de eliminação dos patógenos, eles também interferem nos mecanismos de reabsorção óssea que se processam durante a reação inflamatória.

2 OBJETIVOS

Avaliar o papel dos radicais intermediários de oxigênio e do óxido nítrico no desenvolvimento das alterações perirradiculares, avaliando-se o perfil das citocinas pró-inflamatórias expressas em lesões perirradiculares experimentais em murinos.

2.1 Objetivos específicos:

- a)** Padronizar a técnica do corte e avaliação da lesão periapical em pequenos animais;
- b)** Mensurar a área de reabsorção óssea na região do periápice de camundongos deficientes no gene da gp91 da NADPH oxidase (PHOX^{-/-}) e camundongos deficientes da iNOS (iNOS^{-/-});
- c)** Identificar a presença dos osteoclastos na região periapical;
- d)** Determinar a expressão do mRNA das citocinas IL-1 β , TNF- α , RANK, RANKL, OPG e MCP-1 no tecido periapical do molar do camundongo.
- e)** Identificar as células que expressam mRANKL na lesão periapical por microscopia confocal.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Para este estudo, utilizaram-se três diferentes linhagens de camundongos: C57BL/6 fornecidos pelo CEBIO (Centro de Bioterismo, ICB, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil); PHOX^{-/-} e iNOS^{-/-} fornecidos pelo biotério do laboratório de Gnotobiologia e Imunologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia (ICB) com idade de seis a oito semanas. Para padronização do protocolo, utilizaram-se ratos machos da linhagem Wistar com idade variando de 10 a 12 semanas e peso de 280g - 320g também fornecidos pelo CEBIO. Os animais foram mantidos no biotério de ratos da Prof^a. Ângela Maria Ribeiro, do Departamento de Bioquímica e Imunologia, em gaiolas convencionais com barreiras, em um ambiente onde havia um controle do ciclo de luz. A comida e água foram *ad libitum*. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal. (protocolo número 234/08, CETEA – UFMG).

O estudo em microscopia confocal foi realizado no Instituto de Pesquisa Forsyth, em Boston. Os animais da linhagem C57BL/6 com idade de oito semanas foram adquiridos nos laboratórios da Jackson (Jackson Laboratory, Harbor, ME, EUA) e mantidos no biotério do próprio instituto. Os animais foram mantidos em gaiolas convencionais em um ambiente com ciclo de luz de 12 h. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal (IACUC) do próprio instituto.

3.2 Plano amostral

Para indução de lesões de furca experimentais, utilizaram-se ratos, que foram divididos em três grupos com seis animais cada, sendo que em um desses animais não foi feita qualquer intervenção, representando o grupo controle. Os ratos foram sacrificados 14, 21 e 28 dias após o procedimento operatório.

Os camundongos de todas as linhagens foram divididos em dois grupos com 12 animais cada. Todos os animais foram sacrificados 14 dias após a exposição pulpar por ser o término da fase aguda desse tipo de lesão em camundongos (STASHENKO *et al.* 1994). Desses animais, seis foram utilizados para a análise da expressão gênica e os outros seis para o estudo histológico. Os experimentos foram repetidos duas vezes.

Para os experimentos com a microscopia confocal foram utilizados cinco animais C57BL/6, que foram sacrificados nos intervalos de 3, 7 e 14 dias após a exposição pulpar. Os experimentos foram repetidos duas vezes. O intervalo de 3 dias foi escolhido por ser uma fase de iniciação da lesão. O tempo de 7 e 14 dias é o momento em que a lesão periapical está em sua fase aguda e crônica respectivamente (WANG e STASHENKO, 1993 e STASHENKO *et al.*,1994).

3.3 Indução da lesão periapical

Os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal e os ratos anestesiados por via intramuscular com 100 mg/kg de Ketamina (Dopalen, Division Vet-brands Animal Health, Jacareí, SP, Brasil) e 10 mg/kg de Xilazina (Anasedan, Agribrands do Brasil Ltda, Paulínia, SP, Brasil). Eles foram imobilizados em uma mesa especialmente desenhada para mantê-los com a cavidade oral aberta, possibilitando a visualização

direta dos molares superiores. O dente escolhido para a exposição pulpar e para a perfuração de furca foi o primeiro molar superior direito porque é o dente que possui a maior coroa e portanto, de fácil visualização. Inicialmente, foi feito o acesso coronário utilizando-se uma broca *carbide* com o diâmetro de 0,25 mm (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) acoplada ao motor elétrico de baixa rotação (Driller, São Paulo, SP, Brasil). A câmara pulpar foi exposta e a polpa completamente removida, quando visualizou-se a entrada dos canais. Em seguida, os canais foram instrumentados com a utilização de uma lima K nº. 8. O sistema dos canais radiculares ficou exposto à microbiota da cavidade oral por 3, 7 e 14 dias, ocasionando a formação da lesão periapical. Todo o procedimento cirúrgico foi realizado sob microscopia óptica utilizando-se um microscópio endodôntico de bancada (Alliance, SP, Brasil). O molar superior do lado esquerdo não sofreu intervenção cirúrgica, sendo utilizado como controle.

A perfuração de furca foi criada, utilizando-se uma broca de aço esférica $\frac{1}{4}$ (Maillefer, Petrópolis, RJ, Brasil). A padronização da profundidade da perfuração foi feita empregando-se um cursor colado na broca a 1 mm da sua ponta ativa. O local eleito para iniciar o procedimento foi o centro do assoalho da câmara pulpar.

Para analisar se o modelo seria viável para avaliar a resposta dos tecidos periodontais na região de furca à um material endodôntico, inseriu-se o MTA - Ângelus® (cedido pela Odonto-Lógica, Londrina, PR, Brasil) na perfuração de furca utilizando-se uma sonda clínica. Em seguida, o MTA foi adaptado às paredes da perfuração com um condensador Oddous. Após a inserção do MTA, colocou-se guta-percha sobre o assoalho da câmara para que não houvesse o risco do material restaurador entrar em contato com a perfuração. Em cima da guta-percha, condensou-se o amálgama como restauração permanente do dente. Esse material foi utilizado porque

foi definido como o único material odontológico capaz de resistir à intensa força mastigatória do roedor, permanecendo no dente (ROWE 1967).

3.4 Avaliação Morfométrica

Toda a metodologia descrita abaixo foi realizada com o objetivo de padronizar a forma como a maxila seria extraída, a inclusão na parafina, tempo de descalcificação, direção dos cortes semi-seriados e padronização da região de análise. Essa última padronização foi a mais importante pelo fato de assegurar que se avaliou a mesma região na mesma posição entre os espécimes.

Os ratos foram anestesiados, como descrito anteriormente, e sacrificados por deslocamento cervical 14, 21 e 28 dias após o procedimento cirúrgico de indução da lesão. Aquele em que foi feito o tratamento com MTA foi sacrificado 21 dias após a indução da lesão da furca. Na descrição histológica de cada lâmina, os dados foram analisados pelo grau atribuído à resposta celular, de acordo com o número de células inflamatórias, o tipo de células presentes (polimorfonucleares e mononucleares) e a desorganização tecidual. As hemi-maxilas foram removidas e colocadas em formol a 10% tamponado com fosfato (pH=7,2), durante 48 horas. Em seguida, elas foram lavadas em água destilada e desmineralizadas em ácido etilenodiamino tetra-acético a 10% (EDTA) (período médio de 30 dias com trocas da solução a cada 5 dias). Após este ciclo de desmineralização, as peças foram lavadas em água corrente (20 minutos), desidratadas em soluções de álcool em concentração crescente (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. A inclusão em parafina foi realizada com a face vestibular da peça voltada para o fundo do bloco, de forma que a lâmina do micrótomo à cortasse no sentido corono-apical (da coroa em direção ao ápice

radicular). Os cortes histológicos semi-seriados foram feitos no sentido vestibulo-palatino com espessura de 5 micrômetros tendo como referência o perfil das duas raízes anteriores (disto-vestibular e méso-vestibular) do dente (FIG. 2). As lâminas foram montadas com 15 cortes histológicos em média, obtendo-se 4 lâminas de cada animal. Duas lâminas foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (H&E), uma foi corada pelo Tricrômico de Gomori e uma lâmina foi mantida como reserva.

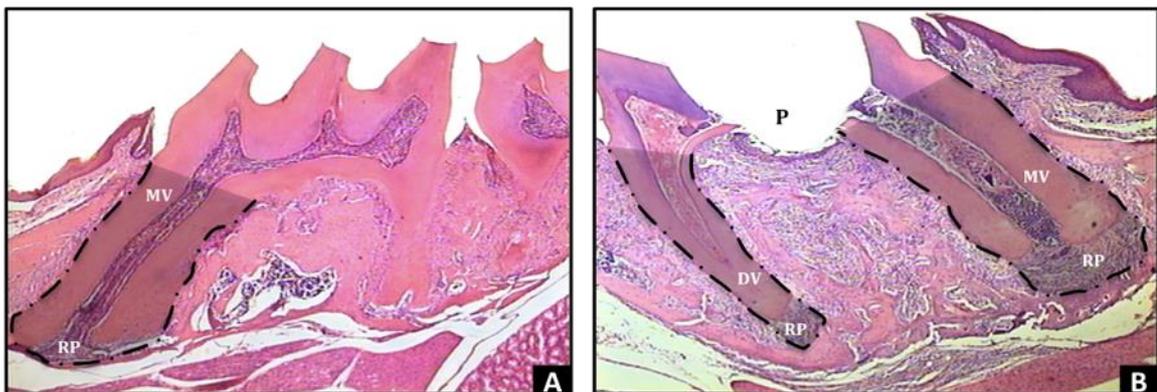


FIGURA 2 - Representação dos molares de ratos utilizados para a padronização dos cortes. O sombreado e área delimitada representam o perfil das raízes méso-vestibular e disto-vestibular. A figura (A) e (B) mostram respectivamente o corte histológico do molar hígido e do molar com a furca perfurada. Ampliação: **X40**. Coloração: **H&E**. MV: **raiz méso-vestibular**. DV: **raiz disto-vestibular**. RP: **região periapical**. P: **perfuração da furca**.

Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical. As hemi-maxilas foram fixadas em formalina à 10% tamponada com fosfato (pH: 7,2) por 8 h em temperatura ambiente. Após esse período de incubação, as amostras foram lavadas em água destilada três vezes por 5 minutos cada. Para possibilitar o corte no micrótomo, as hemi-maxilas foram descalcificadas utilizando-se EDTA 10% (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os exemplares foram incubados por sete dias em temperatura ambiente, trocando-se o EDTA a cada três dias. Após a descalcificação, as amostras foram deixadas imersas em água destilada por uma noite. Em seguida, foram lavadas três vezes durante 5 min. e desidratadas em soluções de álcool em concentrações crescente (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Fez-se a inclusão em

parafina colocando-se a face vestibular da hemi-maxila voltada para o fundo do bloco. O material foi então montado no micrótomo, de forma que a lâmina do mesmo cortasse o bloco no sentido corono-radicular (Silva et al., 2005). A direção dos cortes seriados foi realizada da face vestibular em direção a face palatina em seções de 5 µm de espessura (SILVA *et al.* 2009). Cinco cortes foram coletados em cada lâmina, totalizando três lâminas por animal. A primeira e segunda foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E), enquanto que a terceira foi utilizada para a reação de identificação dos osteoclastos. A reação da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) é considerada específica para osteoclastos por marcar as enzimas resistentes ao tartarato que são típicas destas células multinucleadas. A atividade TRAP foi identificada utilizando-se um kit específico (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Como controle positivo da reação do TRAP, utilizaram-se cortes seriados de hemi-maxilas de ratos. Primeiramente, as lâminas foram desparafinizadas em xilol e desidratadas em álcool. A seguir, foram incubadas na solução do TRAP por uma hora em banho maria a 37°C e, em seguida, contra coradas com hematoxilina de Mayers por 2 min. Finalmente, foram lavadas em água corrente por 20 min e montadas.

3.4.1 Avaliação morfológica da região da furca

Avaliou-se a região adjacente à perfuração na furca. A análise morfológica do infiltrado inflamatório na região abaixo da perfuração foi feita em cada grupo, obtendo-se três lâminas de cada grupo. A seleção dessas lâminas foi baseada na possibilidade de obter pelo menos duas imagens da lesão adjacente à área perfurada sem que houvesse a interposição de tecido duro (dentina ou osso). Estas imagens foram capturadas na objetiva 40X por meio de uma microcâmara JVC TK-1270-RGB e analisadas no software

KS300 Kontron Elektronick/Carl Zeiss (Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha). Uma macro foi construída para capturar, processar e contar todas as células em cada imagem. Os núcleos de leucócitos e todos os núcleos geralmente encontrados nos tecidos periodontais do molar de rato foram contados através da seleção de pixels da imagem real com a criação de uma imagem binária para o processamento. A contagem obtida de um tecido periodontal intacto foi utilizada como padrão de celularidade normal desse tecido.

3.4.2 Avaliação morfométrica da região periapical

A reabsorção óssea periapical foi avaliada medindo-se a área da região periapical. Para isso, as imagens dos cortes de camundongos e ratos foram capturadas em diferentes aumentos utilizando um microscópio óptico com uma câmera JVC TK-1270-RGB acoplada ao mesmo. Os dados obtidos no dente controle representaram a espessura normal do ligamento periodontal na região periapical. Para assegurar que a análise morfométrica estava sendo feita na mesma área nos diferentes cortes, foi utilizada a mesma padronização realizada para ratos Silva *et al.* (2009), onde as regiões periapicais avaliadas foram aquelas associadas com o perfil das duas raízes anteriores (disto-vestibular e mesio-vestibular) com o seu ápice radicular aberto (FIG. 2). Com o software KS300 (Kontron Elektronick/Carl Zeiss), foi feito um traçado para analisar a região periapical (FIG. 3).

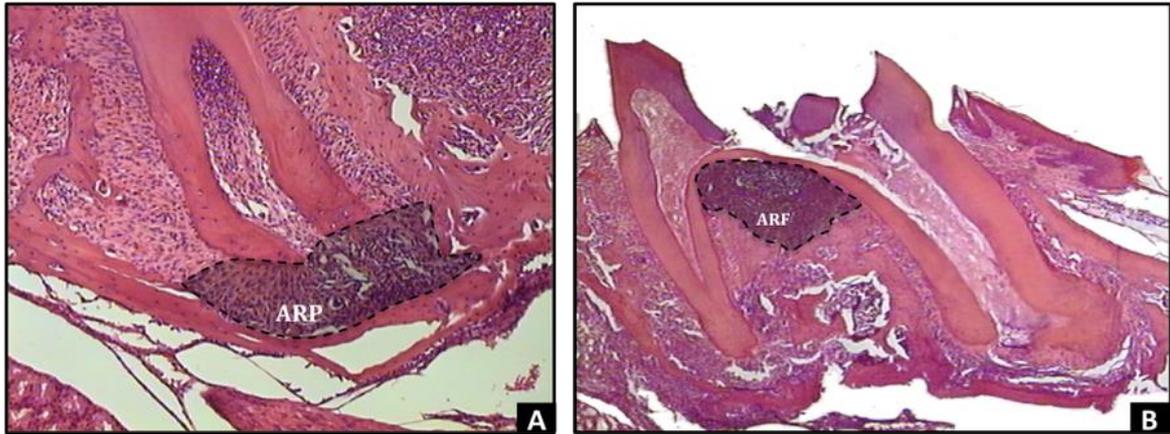


FIGURA 3 – Corte histológico dos molares de camundongos e ratos apontando as regiões periapical e de furca.

A figura (A) mostra a forma como foi feito o traçado para delimitar e medir a área da região periapical. **Ampliação:** X200. A figura (B) demonstra a região de furca onde foi avaliado o número de células. **Ampliação:** X40. **Coloração:** H&E. **ARP:** área da região periapical. **ARF:** área da região da furca.

3.4.3 Quantificação dos osteoclastos

Foram consideradas células TRAP positivas aquelas que possuíam dois ou mais núcleos com grânulos citoplasmáticos marcados por depósitos de cor púrpura à vermelho escuro. Elas foram contadas na superfície óssea da região periapical e a média de cinco animais por grupo foi comparada.

3.4.4 Análise estatística

As análises das lâminas foram realizadas por um examinador que não tinha conhecimento de qual grupo estava sendo estudado. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para verificar se a característica estudada nas amostras era oriunda de uma população com distribuição normal. Por sua vez, a comparação das médias entre dois grupos foi feita pelo teste *t* de Student. Quando a comparação das médias foi feita entre mais de um grupo, foi utilizado o teste de análise da variância simples (*one-way ANOVA*),

seguido do teste *Post-hoc* de Tukey. A diferença foi considerada estatística quando $p < 0,05$.

3.5 Microscopia confocal

As hemi-maxilas foram congeladas imersas em um composto denominado *Tissue-Tek OCT* (Sakura Finetek, Torrance, Ca, EUA) e cortadas no criostato em seções seriadas de 8 μm . Os cortes foram bloqueados usando albumina de soro bovino 2% (BSA) em salina 1% (PBS) por 45 min. A seguir, foram incubados por uma noite a 4°C na presença da osteoprotegerina – Fc biotinizada (OPG-FC-bio)² ou um anticorpo específico para Fator Específico do Osteoblasto 2 (OSF-2), também conhecido como periostina (R&D Systems, Minneapolis, EUA). O OPG-Fc-bio e o OSF-2 foram diluídos em 0,1% BSA em PBS na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Após a incubação *overnight*, os cortes foram lavados quatro vezes com PBS por 5 min cada e os seguintes anticorpos foram adicionados: CD3 cadeia ϵ conjugado com Isocianato de Fluoresceína (FITC) em uma concentração final de 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Em seguida, foram adicionados aos cortes avidina associadas com o *Texas Red* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) diluído 100 vezes em uma solução de PBS com 0,1% BSA. Os cortes foram incubados em temperatura ambiente por 2 h. Logo após, os cortes foram lavados como descrito anteriormente e montados com Fluoromount G (SouthernBiotech, Birmingham, Alabama, EUA). Para assegurar que a fluorescência obtida era devido à ligação específica do anticorpo ao seu receptor, alguns cortes foram incubados com um anticorpo

² A osteoprotegerina foi utilizada para a identificação do RANKL de membrana (mRANKL) por ser um homólogo de RANK, tendo grande afinidade pelo RANKL (KHOSLA 2001). O OPG-Fc-bio foi preparado reagindo a biotina sulfurada – NHS (Pierce, Rochford, IL, EUA) com o OPG-Fc (gentilmente cedido pelo Dr. Dunston, Amgen).

inespecífico associado com FITC (anti-imunoglobulina G de coelho - BD Biosciences) e outros apenas com a avidina associada com o *TexasRed*, representando o controle negativo.

O padrão de fluorescência foi analisado em um aumento de 400 vezes no microscópio confocal Leica TCS/SP-2 (Leica, Wetzlar, Alemanha).

3.5.1 Análise quantitativa e estatística

O número total de células CD3⁺, CD3⁺/RANKL⁺ foi determinado contando-se as células marcadas no campo obtido das imagens escaneadas pelo microscópio. As lâminas marcadas com periostina e RANKL foram avaliadas qualitativamente. Em cada animal foram obtidas três imagens de três cortes diferentes, separados por 16 µm. Fez-se a média da contagem das células dos três cortes. Cada grupo era composto por quatro camundongos (n=4). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para verificar se a característica estudada nas amostras era oriunda de uma população com distribuição normal. A comparação das médias entre dois grupos foi feita pelo teste *t* de Student. Quando a comparação das médias foi feita entre mais de um grupo, utilizou-se o teste de análise da variância univariada (*one-way* ANOVA), seguido do teste *Post-hoc* de Tukey. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

3.6 Avaliação da expressão gênica

A expressão gênica das citocinas IL-1 β , TNF- α , RANK, RANKL, OPG e MCP-1 foi avaliada pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR). Com a utilização de sondas fluorescentes, essa tecnologia permite quantificar exatamente o

número de cópias do RNA mensageiro de cada citocina presente nas amostras, amplificando-se o cDNA obtido a partir dos mRNAs. O *primer* (iniciador) se liga à sua porção complementar no cDNA. A DNA polimerase monta a fita complementar relacionada aos iniciadores, originando produtos do PCR chamados *amplicons*. A quantidade de *amplicons* ao final da reação correlaciona-se com a quantidade inicial do cDNA que, por sua vez, esta relacionada com o número de cópias do mRNA. A sonda fluorescente presente na reação se liga a todos os DNAs de fita dupla. No momento em que ela se liga, a sonda emite fluorescência que é detectada pelo aparelho. À medida que a reação de PCR vai ocorrendo, mais *amplicons* são formados e, conseqüentemente, mais sondas fluorescentes interagem com a fita dupla do DNA. O resultado é um aumento na intensidade de fluorescência proporcional à quantidade de *amplicons* formados durante a reação do PCR.

3.6.1 Extração do RNA

Removeu-se em um único bloco a raiz e o tecido de suporte adjacente. Todo o tecido mole (gengiva e mucosa oral) foram removidos. As amostras foram colocadas em tubos tipo eppendorf contendo 600 µL de TRIzol (GIBCO BRL Laboratories, Grand Island, NY, EUA), trituradas utilizando-se um macerador eletrônico e incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, homogeneizaram-se 200 µL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha) juntamente com a amostra e o TRIzol. A mistura foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugada durante 10 minutos a 12000 *g* a 4°C. A fase clara foi transferida para um tubo eppendorf onde adicionou-se o mesmo volume de isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemanha). Foi acrescentado acetato de sódio ao eppendorf na concentração final de 3 molar para

facilitar a precipitação dos ácidos nucleicos. Após a homogeneização, as amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, a -20°C por 30 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 12000 g a 4°C . Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de etanol 75% sobre o *pellet*. A amostra foi vortexada para soltar o *pellet* e centrifugada nas mesmas condições, por mais 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o eppendorf foi emborcado para secar, numa superfície limpa, durante 15 minutos ou até que todo o álcool evaporasse. O *pellet* foi ressuscitado em $40\text{ }\mu\text{L}$ de água de alta qualidade tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) (Sigma Chemical Co) e em seguida estocado a -70°C .

Para a quantificação do RNA, analisaram-se $2\text{ }\mu\text{L}$ de cada amostra pelo espectrofotômetro Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. A concentração do RNA foi medida em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. O grau de pureza foi determinado pela relação 260/280.

3.6.2 Reação de transcrição reversa

Fez-se a síntese de cDNA pela reação de transcrição reversa. O volume final de cada amostra foi de $12,5\text{ }\mu\text{L}$ contendo: $4\text{ }\mu\text{g}$ de RNA; 250 mM dNTPs; 50 mM TRIS-HCl (pH 8,3); 75 mM KCl, $3,0\text{ mM}$ MgCl_2 , 10 mM DTT (GIBCO/BRL Laboratories, Grand Island, N.Y., EUA), 10 U de RNAsin (Promega Corp., Madison WI, EUA) e $7,0\text{ pM}$ oligo-dT₁₅ (Promega Corp., Madison WI, EUA).

As reações foram realizadas em termociclador Thermo Hybaid (PCR Express, Middlesex, UK) de acordo com o seguinte protocolo: incubação inicial por 5 min. a 95°C , 5 min. a 4°C e 5 min. a 25°C . Neste passo, 25 U de enzima transcriptase reversa-MMLV (Promega Corp., Madison WI, EUA) foram adicionadas a cada amostra e a mistura foi

novamente incubada por 60 minutos a 37°C. A temperatura foi elevada a 95°C por 5 min. e, em seguida, resfriada para 4°C. O cDNA, produto da reação, foi diluído em água Milli-Q autoclavada para um volume final de 25 µL.

3.6.3 PCR em tempo real

Numa primeira fase, foram utilizadas várias diluições dos iniciadores do gene normalizador gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH) e dos cDNAs para determinar as concentrações ideais de cada amostra. Em seguida, diferentes diluições dos iniciadores específicos para cada uma das citocinas: IL-1 β , TNF- α , RANK, RANKL, OPG e MCP-1 foram analisadas para determinar a concentração ótima dos mesmos em cada reação. A tabela 1 mostra as seqüências dos iniciadores utilizados.

Tabela 1 - Seqüência dos iniciadores das citocinas.

Iniciador	Seqüência (5'-3')	Bp
GAPDH	FW TGA AGG GGT CGT TGA TGG RV AAA TGG TGA AGG TCG GTG TG	107
IL-1β	FW CAA CCA ACA AGT GAT ATT CTC CAT RV GAT CCA CAC TCT CCA GCT GCA	151
TNF-α	FW CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA RV TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC	174
RANK	FW TCG GGT TCC CAT AAA GTC AG RV CTG AAG CAA ATG TTG GCG TA	136
RANKL	FW TCG GGT TCC CAT AAA GTC AG RV CTG AAG CAA ATG TTG GCG TA	136
OPG	FW GGA ACC CCA GAG CGA AAT ACA RV CCT GAA GAA TGC CTC CTC ACA	225
MCP-1	FW CTT CTG GGC CTG CTG TTCA RV CCA GCC TACT CA TTG GGA TCA	126

FW (*forward primer*); RV (*reverse primer*); Bp (*base pair*).

As reações de PCR em tempo real foram executadas no equipamento Step One Real Time PCR Systems utilizando o kit SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Em cada poço de reação adicionou-se 1 µL do cDNA puro, 1 µL dos iniciadores específicos (concentração final de 0,06 pM para o GAPDH e 0,5 pM para os demais iniciadores), 10 µL do SYBER Green *master mix* e água para um volume final de 20 µL. Em seguida, as placas foram colocadas no termociclador e as reações de amplificação foram realizadas de acordo com o seguinte protocolo: 10 min. a 95°C, 40 ciclos de 95°C durante 15 seg. e 60°C por 1 min.; seguida da curva de dissociação com incubação a 95°C por 15 seg., 60°C por 1 hora e aquecimento até 95°C com análise simultânea.

No que se refere à avaliação de especificidade, foi executada a análise das curvas de dissociação ao final de cada reação, para distinguir o sinal de fluorescência originado dos *amplicons* específicos daqueles relacionados com dimerização de iniciadores ou outros artefatos.

A expressão dos genes foi quantificada pelo método de Ct comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Tratamento - ΔCt Controle), que se baseia na comparação de expressão do gene-alvo (normalizado para o controle endógeno) entre o grupo experimental e o grupo controle. A análise dos perfis de amplificação foi baseada no ciclo no qual o Ct (*Threshold cycle*) é atingido. Os resultados obtidos foram corrigidos automaticamente pelo Step one™ Software v 2.0, de acordo com o valor correspondente ao nível basal de fluorescência medido nos primeiros ciclos da reação, antes da detecção da amplificação. O gene GAPDH foi utilizado para normalizar todos os valores nos ensaios de PCR em tempo real, uma vez que não apresentou nenhuma variação na expressão nas condições analisadas.

3.6.4 Análise estatística do RT-PCR

Os resultados foram expressos como quantificação relativa (RQ), ou seja, este índice expressa a variação relativa do gene em estudo do grupo experimental em relação ao grupo controle. O teste de Kolgomorov-Smirnov foi aplicado para verificar se a característica estudada nas amostras era oriunda de uma população com distribuição normal. A comparação das médias entre dois grupos foi feita pelo teste *t* de Student. Quando a comparação das médias foi feita entre mais de um grupo, foi utilizado o teste de análise da variância univariada (*one-way ANOVA*), seguido do teste *Post-hoc* de Tukey. A diferença foi considerada estatística quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Resultados descritivos dos experimentos em ratos

4.1.1 14 dias após a intervenção

As amostras apresentaram o ligamento periodontal desorganizado próximo à área de perfuração (FIG. 4A e 4B). Foi observado intenso infiltrado inflamatório constituído, predominantemente, de mononucleares e polimorfonucleares, estes últimos localizados mais superficialmente, adjacentes à área de perfuração. Também foi observado edema separando os elementos teciduais, grande quantidade de pequenos vasos neoformados (FIG. 4B). O tecido ósseo se encontrava em atividade osteoclástica, com visível destruição óssea das áreas mais superficiais (FIG. 4A). Também, houve desorganização e reabsorção do cimento e dentina radicular.

4.1.2 21 dias após a intervenção

O grupo de 21 dias apresentou o tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório crônico rico em células mononucleares próximo da área da perfuração. As regiões distantes da perfuração e próximas do tecido ósseo apresentaram menor celularidade com deposição de colágeno indicando um processo de reparação (FIG. 4C). O grupo de 21 dias apresentou infiltrado inflamatório de característica crônica, em relação ao grupo de 14 dias. Além disso, observou-se neoformação vascular (FIG. 4D).

4.1.3 28 dias após a intervenção

Nesse grupo, foi observado infiltrado inflamatório crônico de menor intensidade. Além disso, reorganização do ligamento periodontal (FIG. 4E). Em uma amostra, notou-se pequenos focos de necrose com piócitos, e alguns polimorfonucleares preservados próximos às formações ósseas mais profundas (FIG. 4F).

4.1.4 Grupo tratado com MTA 21 dias após a intervenção

O grupo tratado com MTA 21 dias após o procedimento operatório apresentou debris na área de perfuração, provavelmente, remanescentes do MTA que foi removido antes do preparo do material para obtenção das lâminas histológicas. O tecido conjuntivo apresentou um infiltrado inflamatório mononuclear com áreas de infiltrado polimorfonuclear. (FIG. 5A e 5B).

4.1.5 Resultados analíticos

O grupo controle teve um infiltrado inflamatório menor que o os animais sacrificados 14 e 21 dias após o procedimento cirúrgico ($p < 0,05$) (FIG. 5C). Este infiltrado chegou aos valores próximos do grupo controle 28 dias após o procedimento.

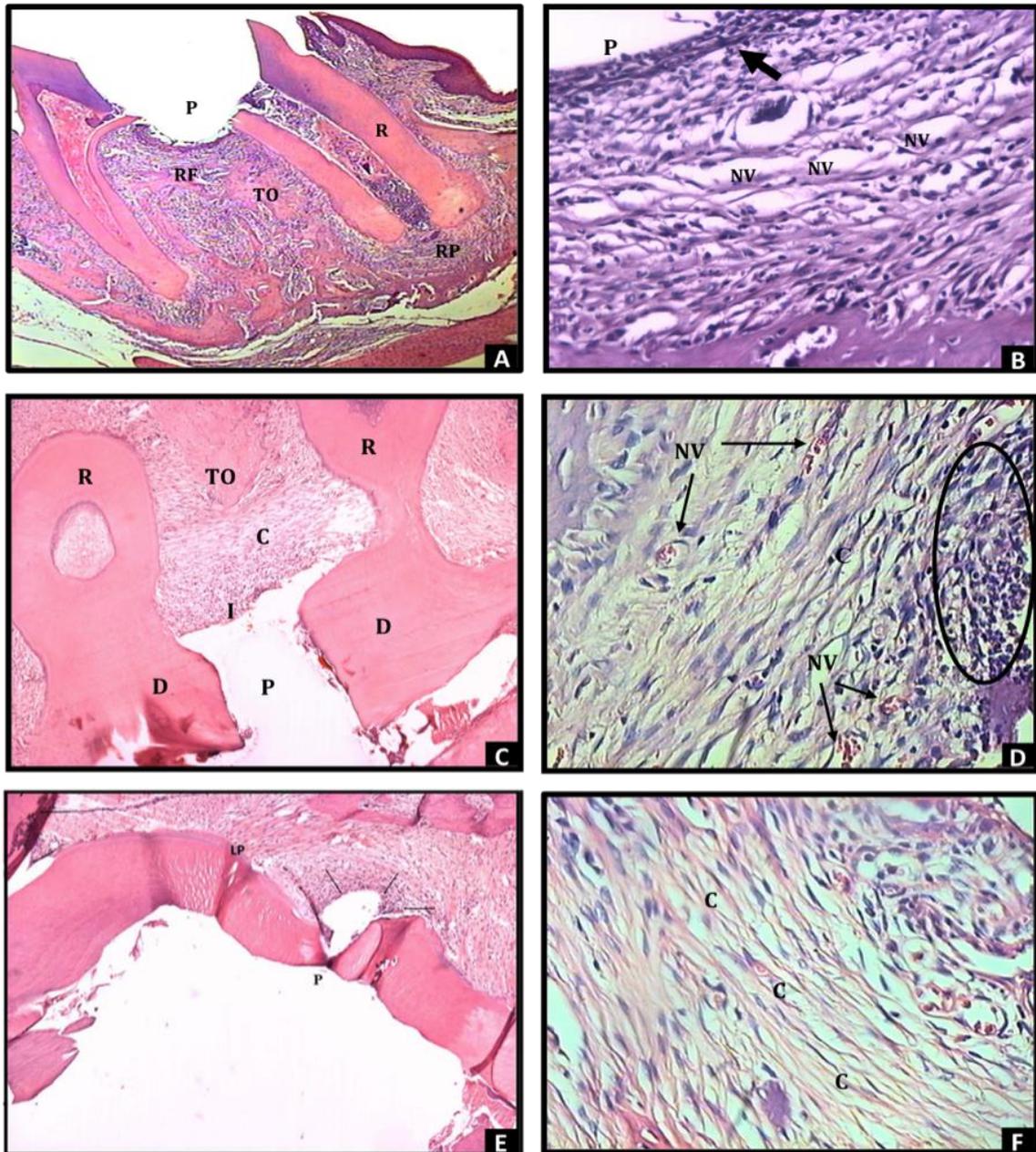


FIGURA 4 – Tecido periodontal de rato mostrando a lesão de furca nos diferentes tempos operatórios.

(A) e (B) mostram o aspecto da lesão da furca 14 dias após o procedimento operatório. Em maior aumento, observa-se a camada de células inflamatórias crônicas infiltradas na periferia da perfuração (seta) formando uma camada. Nota-se ainda reação do tecido subjacente que mostra neoformação vascular. Em (C) e (D) pode-se observar a aparência da lesão da furca no tempo operatório de 21 dias. Observa-se infiltrado inflamatório denso próximo da perfuração e área de deposição de colágeno próxima ao tecido ósseo. (E) e (F) representa a área da perfuração após 28 dias. Observe maior infiltrado inflamatório próximo da perfuração e, em maior aumento, a deposição do colágeno. **Ampliação:** figuras (A), (C) e (E) = X40. **Ampliação:** figuras (B), (D) e (F) = X400. **Coloração:** H&E. **TO:** tecido ósseo. **LP:** ligamento periodontal. **P:** perfuração. **R:** raiz. **RF:** região de furca. **RP:** região periapical **C:** colágeno. **R:** Raiz. **I:** infiltrado inflamatório. **D:** dentina. **NV:** neoformação vascular. **○** (área delimitada): células mononucleares.

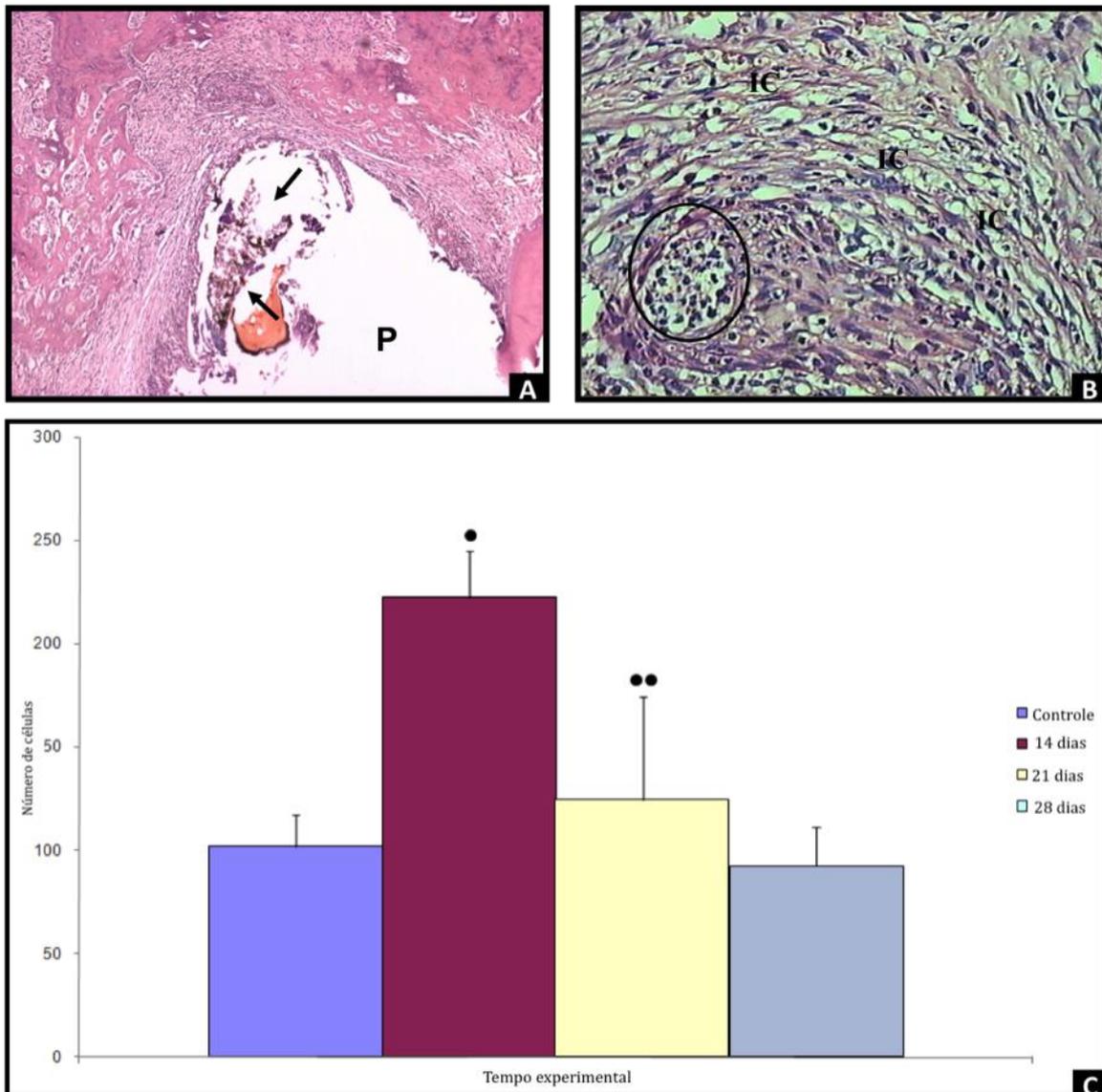


FIGURA 5 – Tecido periodontal de rato tratado com MTA e representação gráfica da contagem do número de células.

(A) e (B) mostram o aspecto da perfuração da furca 21 dias após o tratamento com MTA. Em detalhe, o tecido conjuntivo próximo à área perfurada. Observa-se grande parte da área com infiltrado de células mononucleares e focos de células polimorfonucleares (área delimitada). (C) Média do número total de células presente nas áreas abaixo da perfuração no grupo controle e nos três tempos operatórios (14, 21 e 28 dias). • indica diferença estatística entre o grupo controle e 14 dias após a intervenção cirúrgica. ($p < 0,05$). •• indica diferença estatística entre o grupo controle e 28 dias após a intervenção cirúrgica. **Ampliação:** figura (A) = X40. **Ampliação:** figura (B) = X400. **Coloração:** H&E. **P:** perfuração. **IC:** infiltrado inflamatório crônico. ○ (área delimitada): células polimorfonucleares.

4.2 Lesões periapicais e presença de osteoclastos na região periapical de camundongos C57BL/6, iNOS^{-/-} e PHOX^{-/-}

Observou-se que as amostras do grupo controle da linhagem C57BL/6 apresentaram a polpa radicular com aspecto normal: camada odontoblástica organizada em forma de paliçada, extensamente celularizada e vascularizada. O tecido periapical encontrava-se rico em fibras colágenas ordenadas e inseridas no cimento radicular e osso alveolar. Não se observou sinal de qualquer infiltrado inflamatório nos cortes analisados (FIG. 6A). Após 14 dias, observou-se um aumento na espessura do ligamento periodontal devido à intensa atividade de reabsorção óssea. As fibras do ligamento periodontal encontravam-se desorganizadas devido ao intenso infiltrado inflamatório rico em células mononucleares. É interessante notar que, em alguns casos, houve grande interposição de tecido conjuntivo e deposição de colágeno entre o ápice radicular e o osso alveolar. (FIG. 6B).

Nos animais iNOS^{-/-}, o grupo controle apresentou as mesmas características morfológicas daquelas observadas nos animais C57BL/6 (FIG. 6C). Entretanto, após 14 dias da exposição pulpar, o aspecto da lesão periapical encontrava-se diferente. A espessura do ligamento periodontal era maior, indicando maior atividade de reabsorção óssea. A deposição de colágeno (o que indica um processo cicatricial) foi menor comparada com aquela observada nos camundongos C57BL/6. Além disso, o infiltrado inflamatório era misto devido à presença de células mononucleares e polimorfonucleares (FIG. 6D).

Observou-se nos animais PHOX^{-/-} que o grupo controle apresentou o mesmo aspecto histológico daquele das linhagens C57BL/6 e iNOS^{-/-} (FIG. 6E). Surpreendentemente, após 14 dias, o aspecto da lesão periapical não foi muito diferente quando comparado ao controle já que a espessura do ligamento periodontal encontrava-se levemente aumentada e com discreto infiltrado inflamatório (FIG. 6F).

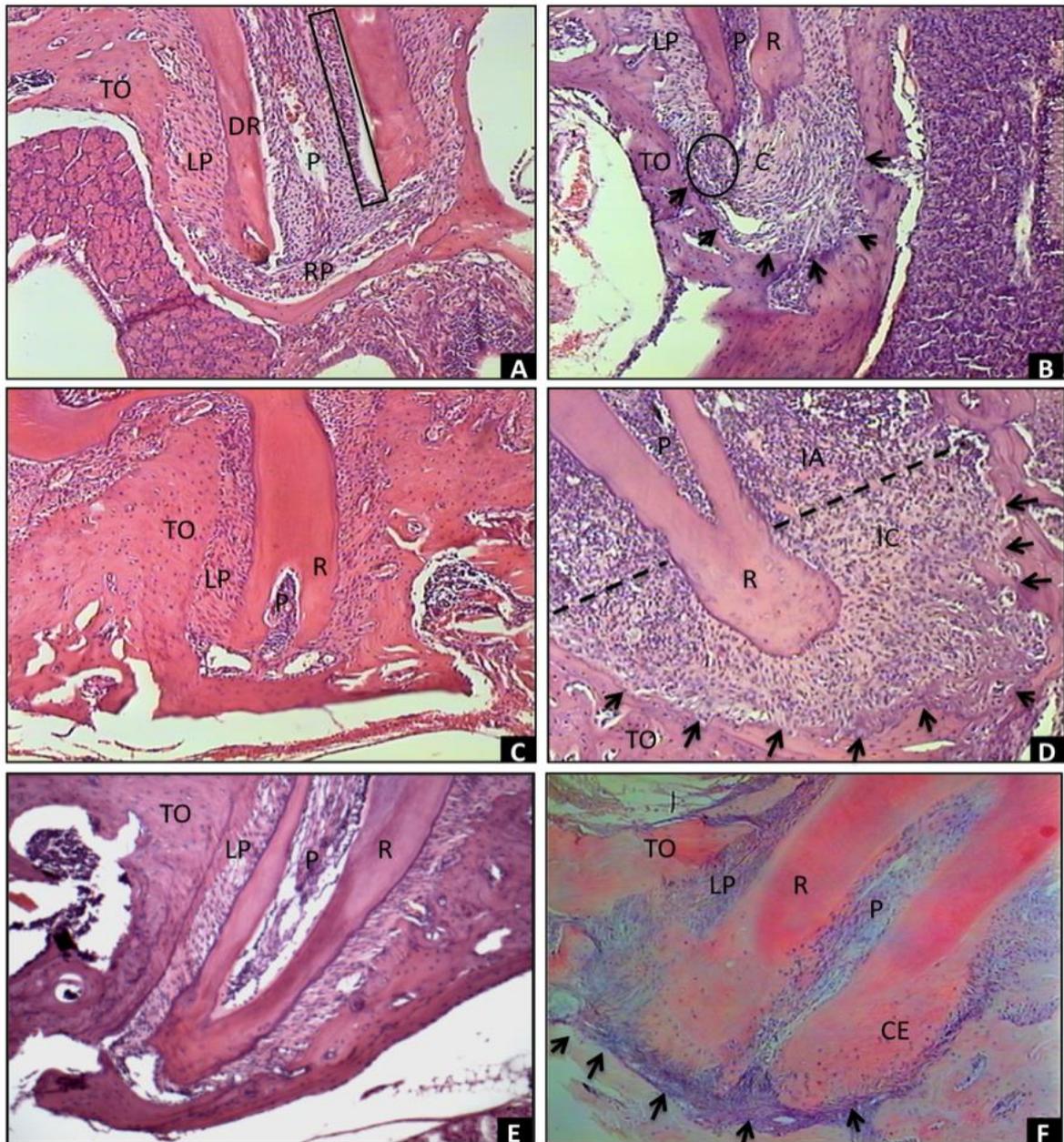


FIGURA 6 – Corte histológico da região periapical em molares de camundongo.

(A), (C) e (E) representam, respectivamente, a região periapical do grupo controle das linhagens C57BL/6, *iNOS*^{-/-} e *PHOX*^{-/-}. (B), (D) e (F) representam a lesão periapical estabelecida 14 dias após a exposição pulpar nas linhagens C57BL/6, *iNOS*^{-/-} e *PHOX*^{-/-} respectivamente.

Ampliação: X100. **Coloração:** H&E. **TO:** tecido ósseo. **DR:** dentina radicular. **LP:** ligamento periodontal. **P:** polpa radicular. **RP:** região periapical. **C:** colágeno. **R:** Raiz. **IA:** infiltrado inflamatório agudo. **IC:** infiltrado inflamatório crônico. **CE:** cimento. **○** (área delimitada): células mononucleares. **Retângulo:** mostra o aspecto normal da camada odontoblástica. (-----): linha separando as áreas com tipos diferentes de infiltrado inflamatório. **↘**(seta): as setas estão delimitando a lesão periapical.

Os resultados da análise morfométrica da lesão periapical no grupo experimental demonstraram que a área da região periapical nos animais *iNOS*^{-/-} foi maior comparada a dos animais C57BL/6 e *PHOX*^{-/-} ($p < 0,05$) (FIG. 7). Quando os grupos controle e experimental nas linhagens *iNOS*^{-/-} e *PHOX*^{-/-} foram comparados, a área da região periapical foi menor nos grupos controles comparada ao grupo experimental ($p < 0,05$). Entretanto, na linhagem C57BL/6, os grupos foram considerados iguais ($p > 0,05$) (FIG. 7).

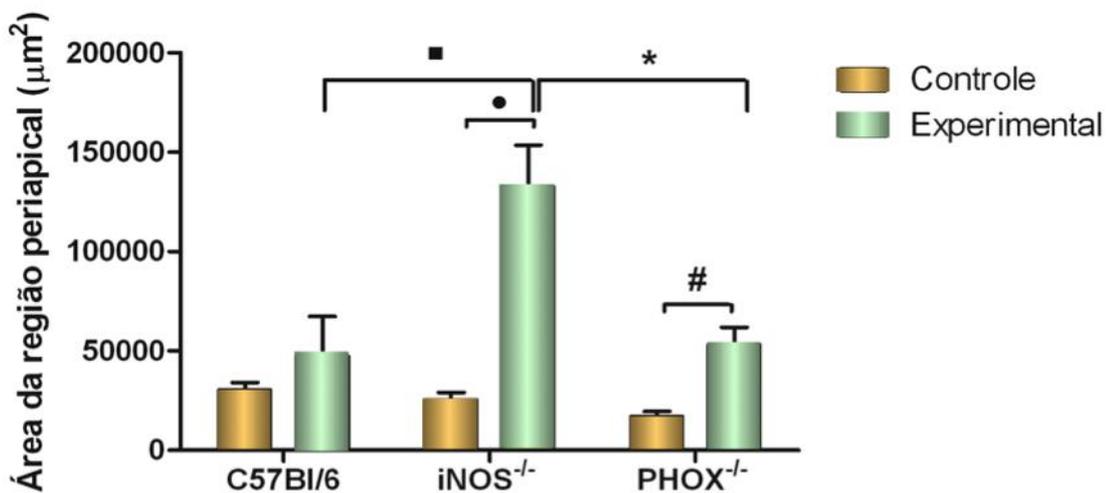


FIGURA 7 – Análise morfométrica da região periapical.

As colunas indicam a média das áreas da região periapical de quatro animais diferentes. As barras indicam o erro padrão (\pm SE). ■ representa a diferença estatística do grupo experimental entre as linhagens C57BL/6 e *iNOS*^{-/-} ($p < 0,05$). • indica diferença estatística entre os grupos experimental e controle dos animais *iNOS*^{-/-} ($p < 0,05$). * indica diferença estatística do grupo experimental entre as linhagens *iNOS*^{-/-} e *PHOX*^{-/-} ($p < 0,05$). # indica diferença estatística entre os grupos experimental e controle dos animais *PHOX*^{-/-} ($p < 0,05$). Os experimentos foram repetidos duas vezes.

A análise microscópica das lâminas coradas com TRAP mostrou que foram raros os casos de células TRAP positivas no grupo controle de todas as linhagens (FIG. 8A, 8C e 8E). Nos grupos experimentais, 14 dias após a exposição pulpar, o número de

osteoclastos nos animais *iNOS*^{-/-} foi maior do que nos animais C57BL/6 (FIG. 8B, 8D e 8F). Foram encontradas células TRAP positivas no tecido periodontal de ratos (grupo controle positivo) contendo três ou mais núcleos (FIG. 9A e 9B). Os animais deficientes da *iNOS* apresentaram o número de células TRAP positivas menor no grupo controle comparado ao grupo experimental ($p < 0,05$) (FIG. 9C). Em contra partida, não houve diferença comparando os mesmo grupos na linhagem C57BL/6. Surpreendentemente, não foram encontradas células marcadas com TRAP nas lâminas analisadas da linhagem *PHOX*^{-/-} (FIG. 9C).

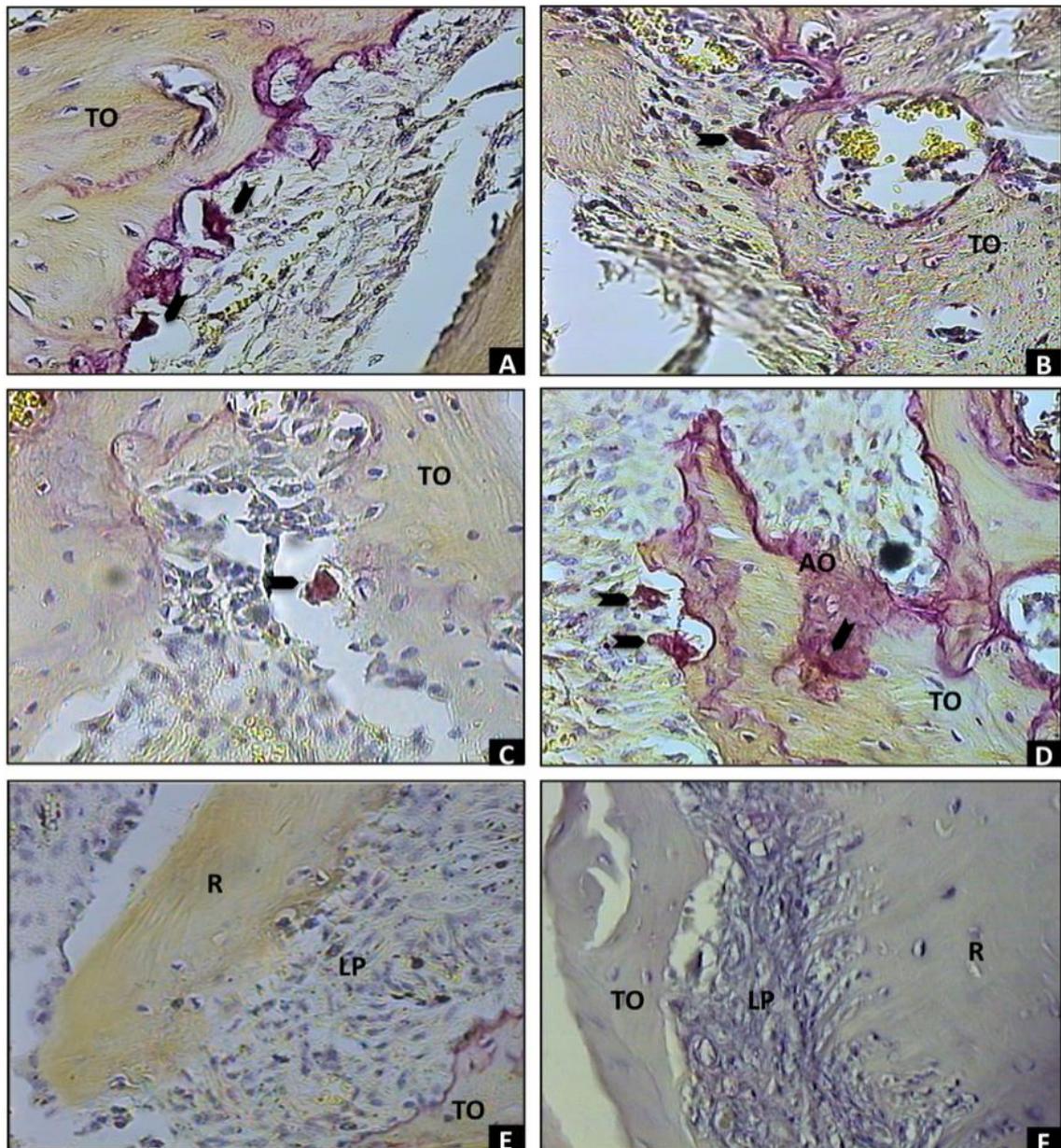


FIGURA 8 - Microfotografias representativas da marcação TRAP em todas as linhagens.

As figuras representam os osteoclastos marcados com a coloração TRAP na superfície óssea da região periapical. As figuras (A), (C) e (E) representam respectivamente o grupo controle das linhagens C57BL/6, iNOS^{-/-} e PHOX^{-/-}. Da mesma maneira, as figuras (B), (D) e (F) representam os grupos experimentais 14 dias após a exposição pulpar. **Ampliação:** X400. **Coloração:** TRAP contra corado com hematoxilina. **TO:** tecido ósseo. **LP:** ligamento periodontal. **R:** raiz. **AO:** Área de osteólise. **↘(seta):** indicam as células TRAP positivas.

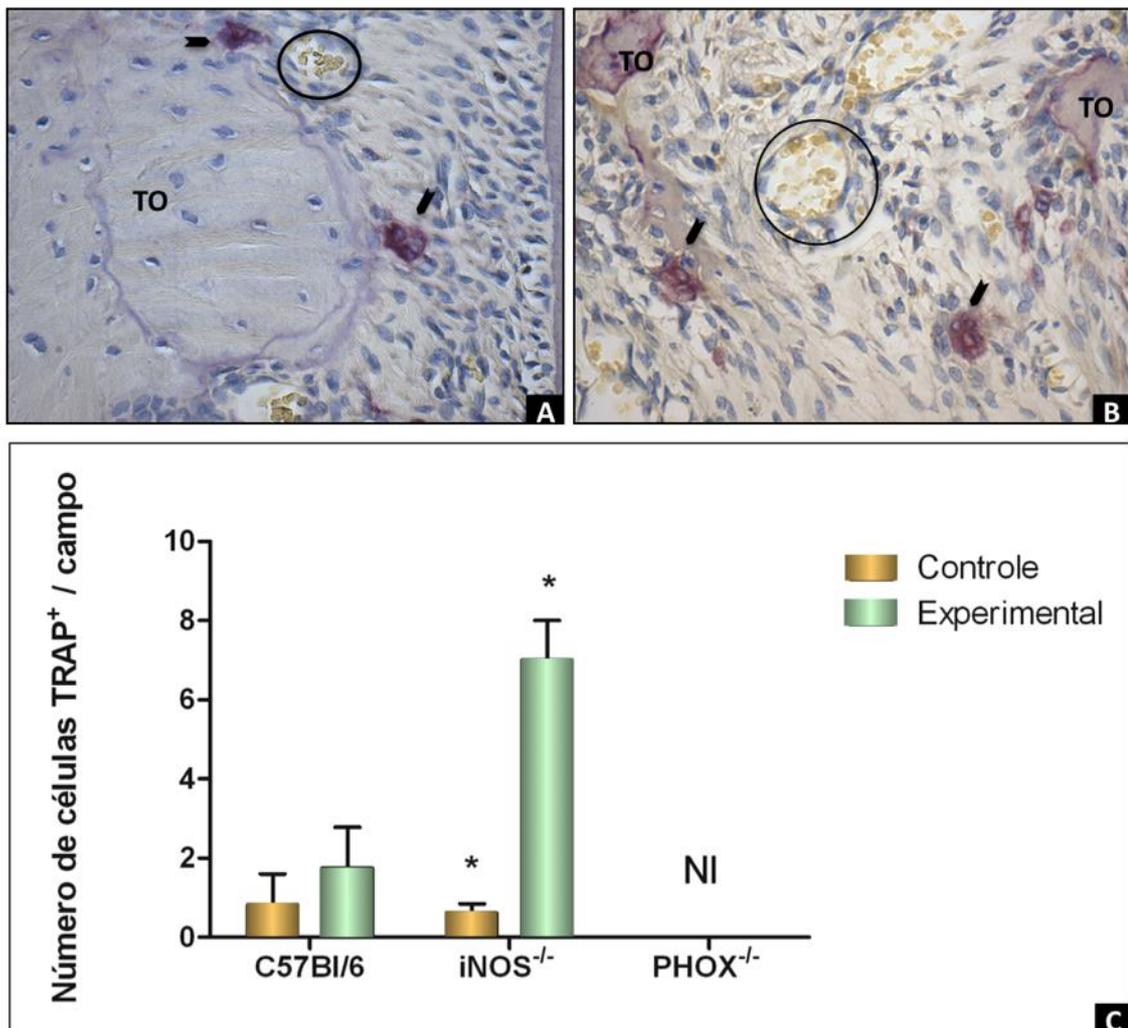


FIGURA 9 – Microfotografias representativas da marcação TRAP no tecido periodontal de ratos e a quantificação do número de células TRAP positivas.

As figuras (A) e (B) representam o controle positivo da técnica de marcação do TRAP em tecido periodontal de ratos, indicando que o método para marcação dos osteoclastos estava funcionando. (C) o gráfico representa os valores obtidos após a contagem do número de células TRAP positivas. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). **Ampliação:** X400. **Coloração:** TRAP contra corado com hematoxilina (**TO**): tecido ósseo. **NI:** não identificado. ○ indica os vasos sanguíneos, ↘(seta): indicam as células TRAP positivas.

4.3 Expressão de mRANKL em células CD3⁺ e periostina⁺ na lesão periapical

Como descrito na metodologia, as células dos tecidos de camundongos C57BL/6 foram marcadas com OPG-FC-Bio seguido do *TexasRed* associado à avidina, e anti-CD3 associado ao FITC. Células marcadas foram encontradas na região periapical do grupo controle e naquela dos animais experimentais, que tiveram a polpa exposta nos períodos de 3, 7 e 14 dias após o procedimento operatório. O tecido periapical do animal controle não apresentou marcação para OPG e anti-CD3 na região periapical (FIG. 10A). Entretanto, na porção medular do osso alveolar, células CD3⁺ e mRANKL⁺ foram detectadas (FIG. 10B). Três dias após a exposição pulpar, o número de células CD3⁺ expressando mRANKL aumentou consideravelmente na região periapical e na medula óssea do osso alveolar (FIG. 10C e 10D). Sete dias após a exposição, as células CD3⁺ expressando mRANKL continuavam sendo detectadas nas mesmas regiões (FIG. 11A e 11B). No dia 14, não houve marcação para CD3 ou mRANKL na região periapical, mas observou-se marcação positiva no espaço medular do osso alveolar (FIG. 11C e 11D). Embora no osso alveolar o número de células CD3 positivas no grupo experimental não tenha sido diferente quando comparado àquele observado no grupo controle, a porcentagem de células CD3 positivas expressando mRANKL foi maior no primeiro ($p < 0,05$) (FIG. 12C e 12D).

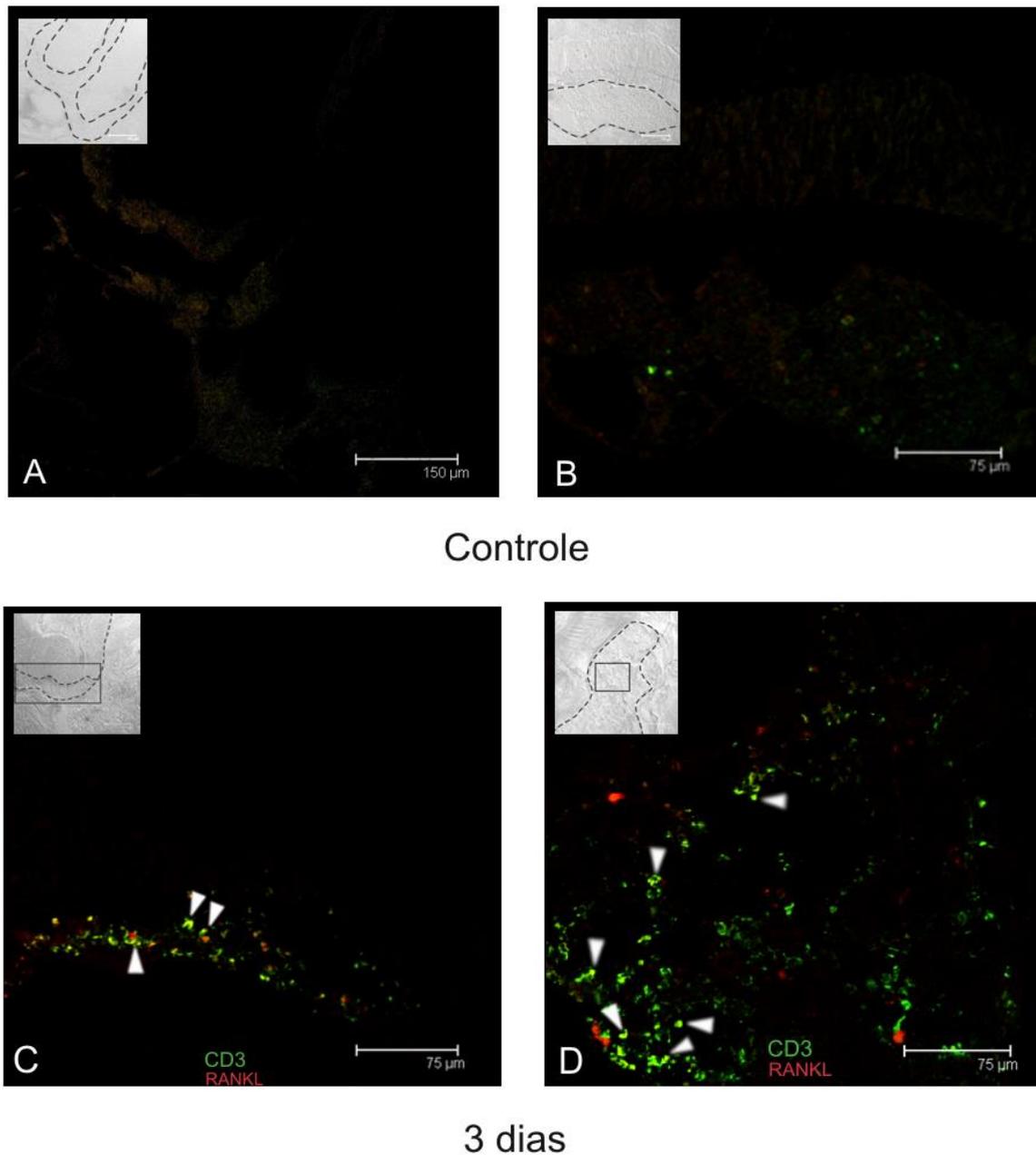


FIGURA 10 – Marcação das células RANKL⁺/CD3⁺ na região periapical e espaço medular do osso alveolar nos camundongos C57BL/6.

As figuras representam a região periapical (A e C) e o espaço medular do osso alveolar (B e D) no grupo controle e três dias após a exposição pulpar. Os cortes foram marcados com anticorpo anti-CD3-FITC (verde) para identificação dos linfócitos T e OPG-FC-biotina/TexasRed-avidina (vermelho) para identificação das células expressando mRANKL. As setas brancas indicam a colocalização de CD3⁺/RANKL⁺. O campo trans de cada imagem está representado como inserto em cada figura (A-D). A barra indica a escala.

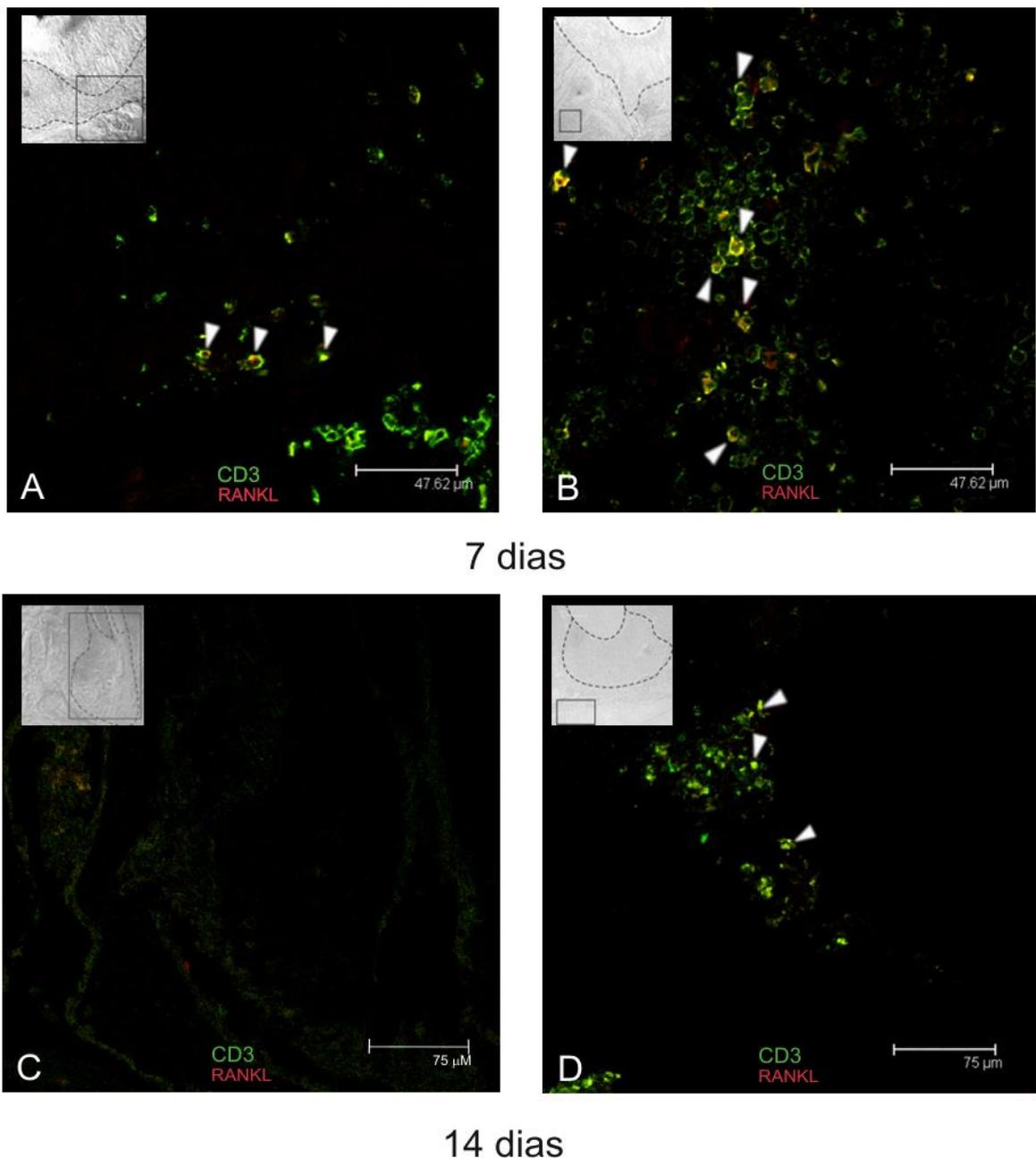


FIGURA 11 - Marcação das células RANKL⁺/CD3⁺ na região periapical e espaço medular do osso alveolar em camundongos C57BL/6.

As figuras representam a região periapical (A e C) e o espaço medular do osso alveolar (B e D) sete e 14 dias após a exposição pulpar. Os cortes foram marcados com anticorpo anti-CD3-FITC (verde) para identificação dos linfócitos T e OPG-FC-biotina/*TexasRed*-avidina (vermelho) para identificação das células expressando mRANKL. As setas brancas indicam a colocalização de CD3⁺/RANKL⁺. O campo trans de cada imagem está representado como inserto em cada figura (A-D). A barra indica a escala.

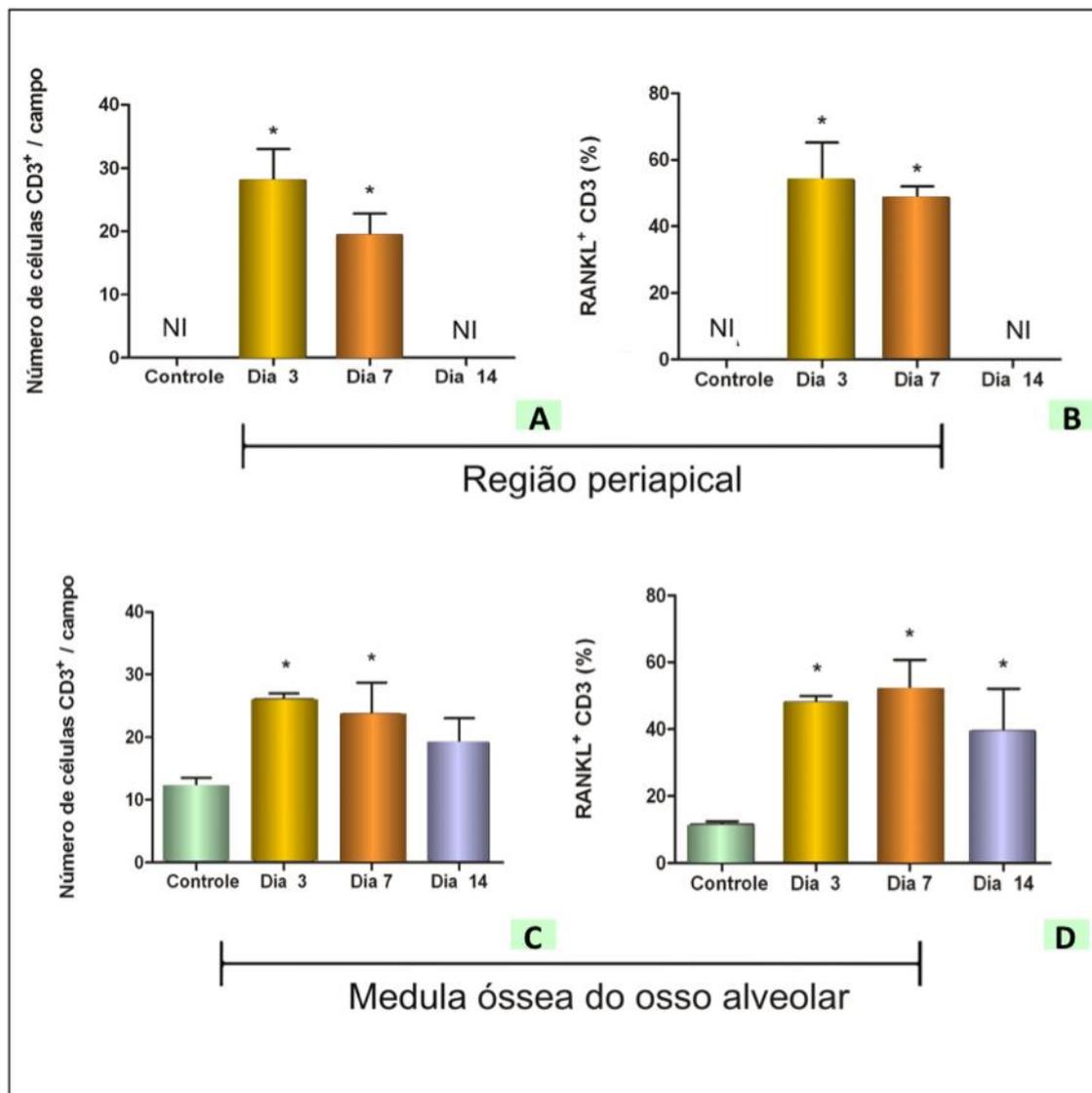


FIGURA 12 – Representação gráfica do número de células CD3⁺ e RANKL⁺ em camundongos C57BL/6.

Avaliação quantitativa do número total de linfócitos CD3⁺ (A e C) bem como a porcentagem dos linfócitos CD3⁺ expressando mRANKL (B e D) na região periapical (A e B) e medula óssea do osso alveolar (C e D). As colunas representam a média das células contadas por campo (n=4). As barras indicam o erro padrão (\pm SE). * indica o número de células estatisticamente maior comparado com o grupo controle ($p < 0,05$). **NI**: não identificado.

Para avaliar se fibroblastos ou osteoblastos expressavam mRANKL, os tecidos foram marcados com anti-periostina e OPG-Fc-bio. No grupo controle, observou-se forte associação do anticorpo anti-periostina com células do ligamento periodontal, o que demonstra que a maioria das células ali presentes eram fibroblastos (FIG. 13A). Após 3 dias, já havia células mRANKL e periostina positivas, indicando que fibroblastos e osteoblastos podem expressar mRANKL nas fase inicial da lesão periapical (FIG 13B). Além disso, algumas células mononucleares também expressavam mRANKL (FIG 13C).

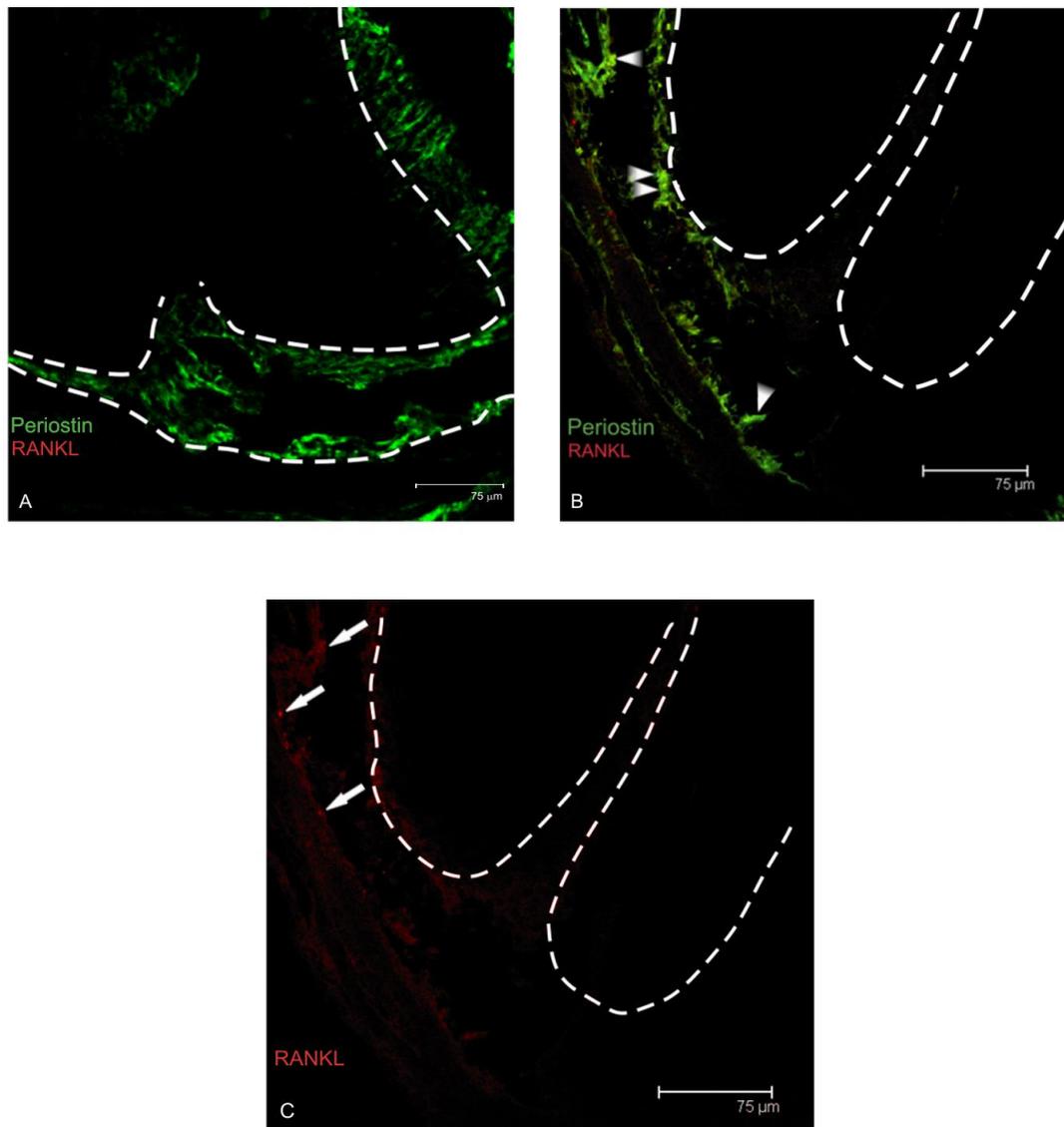


FIGURA 13 – Expressão de periostina e mRANKL na região periapical do grupo controle e três dias após a exposição pulpar nos camundongos C57BL/6. Amostras do tecido periapical do grupo controle (A) e do grupo experimental (B e C). (B) representa a marcação com anti-periostina FITC (verde) e OPG-FC-biotina (vermelho) e (C) representa a marcação com OPG-FC-biotina para identificação das células que expressavam mRANKL. As cabeças das setas brancas indicam a colocalização de periostina⁺/RANKL⁺. As setas representam monócitos expressando mRANKL. A barra indica a escala.

4.4 Expressão de citocinas na lesão periapical

A FIG. 14 mostra que a expressão de IL-1 β , TNF- α , RANK, RANKL e MCP-1 encontrava-se aumentada no grupo experimental quando compara-se com aquele observado no grupo controle nos animais deficientes da iNOS. Essa diferença não foi observada entre os grupos controle e experimental nas linhagens C57BL/6 e PHOX^{-/-}. (p<0,05). A expressão destas mesmas citocinas foi menor nos animais C57BL/6 comparado aos animais iNOS^{-/-} (p<0,05). Nos animais PHOX^{-/-}, a expressão das citocinas foi menor comparada à detectada nos animais iNOS^{-/-}. O elevado desvio padrão mostra que a expressão do OPG variou entre os grupos, bem como dentro do mesmo grupo. Não houve diferença estatística em relação à expressão de OPG nos grupos estudados (FIG 14).

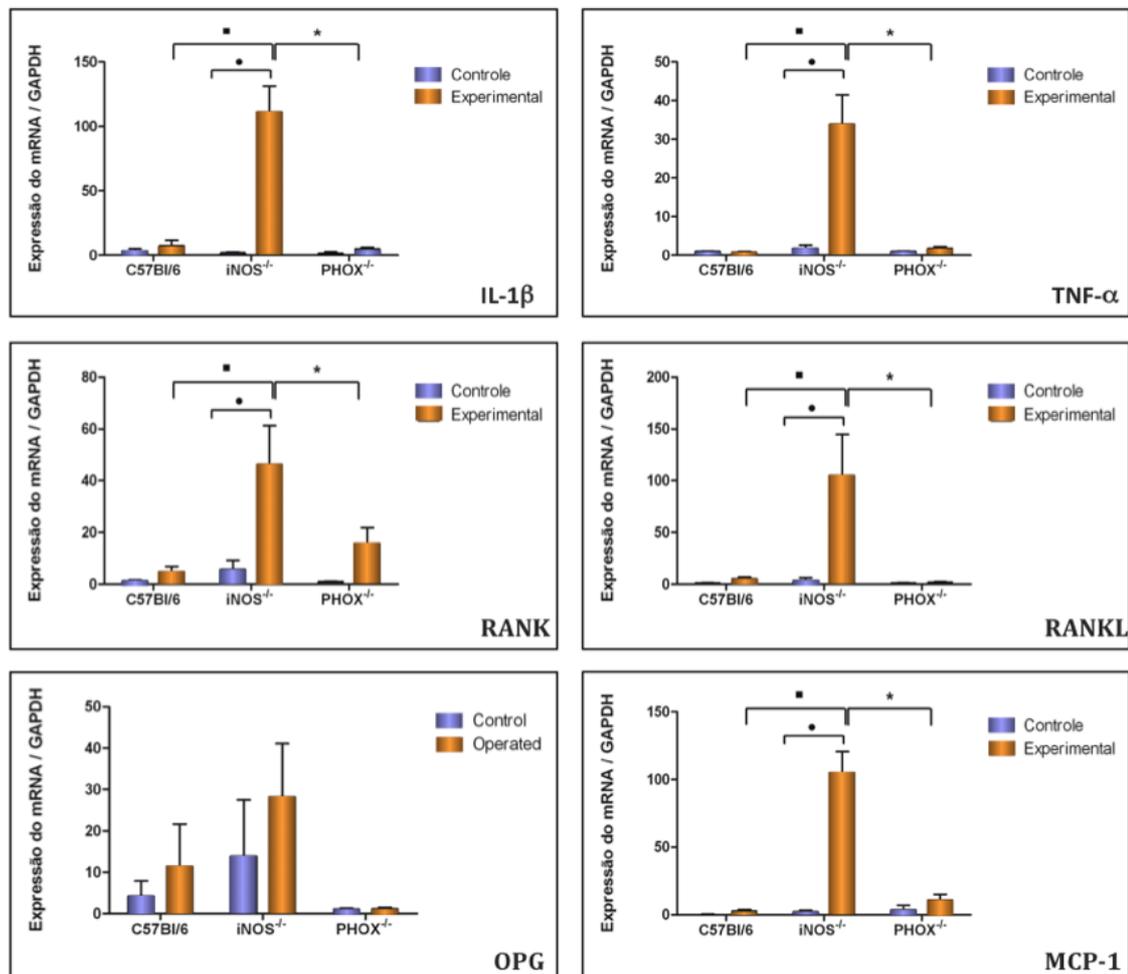


FIGURA 14 – Expressão das citocinas na região periapical dos camundongos C57BL/6, iNOS^{-/-} e PHOX^{-/-} 14 dias após a exposição pulpar.

A expressão das citocinas IL-1 β , TNF- α , RANKL, RANK, OPG e MCP-1 foi detectada por PCR em tempo real. A normalização dos resultados foi baseada na expressão do gene constitutivo GAPDH. As colunas indicam a média da expressão do mRNA de cinco animais diferentes. As barras indicam o erro padrão (\pm SE). O experimento foi repetido duas vezes. ■ representa a diferença estatística do grupo experimental entre as linhagens C57BL/6 e iNOS^{-/-} ($p < 0,05$). • indica diferença estatística entre os grupos experimental e controle dos animais iNOS^{-/-} ($p < 0,05$). * indica diferença estatística do grupo experimental entre as linhagens iNOS^{-/-} e PHOX^{-/-} ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, procurou-se realizar a padronização dos cortes histológicos utilizando-se um modelo de indução de lesões na região de furca em ratos. Tal modelo foi de extrema valia quando se estudou as alterações inflamatórias nos tecidos perirradiculares dos camundongos

O papel do NO e ROS é ainda hoje objeto a ser pesquisado nas diferentes infecções, incluindo-se aquelas de origem endodôntica. Em nosso estudo, o papel destes mediadores na patogênese das lesões perirradiculares foi avaliado por meio de um modelo de infecção animal bem utilizado pela comunidade científica. Utilizaram-se camundongos selvagens C57BL/6 e animais *knockout* para iNOS e PHOX com o mesmo *background*.

Observamos que as lesões perirradiculares induzidas nos animais iNOS^{-/-} apresentavam maior tamanho que aquelas dos animais PHOX^{-/-} e selvagens. Diversos trabalhos têm demonstrado que o NO produzido a partir da iNOS é um dos fatores de migração de células Th1 para os sítios da infecção (KAWAI *et al.* 1999, NORMAN *et al.* 2008, BOGDAN *et al.* 2000, KUBES 2000). Sendo assim, os resultados desta pesquisa podem ser correlacionados a uma resposta imune do tipo 1. Neste contexto, Norman *et al.* (2008) demonstraram em um modelo murino de migração celular que o recrutamento das células Th1 foi inibido após o tratamento com IFN- γ . Contudo, naquele experimento, se o camundongo fosse previamente tratado com um inibidor da iNOS, o efeito inibitório do IFN- γ na migração de células Th1 não ocorria, ficando assim demonstrada a influência do NO na migração desse tipo celular. Os mesmos autores obtiveram resultados similares utilizando camundongos iNOS^{-/-}.

Do exposto, podemos inferir que a maior reabsorção óssea observada nos animais *iNOS*^{-/-} pode estar relacionada ao estabelecimento de uma resposta do tipo 1 nos tecidos perirradiculares do periápice dos dentes portadores de uma infecção radicular.

A produção de NO e de espécies reativas de nitrogênio por macrófagos e neutrófilos é essencial para a atividade microbicida dessas células (WEI *et al.* 1995, FIERRO *et al.* 1999, GYURKO *et al.* 2005). Consequentemente, a ausência da *iNOS* diminui a ação dos macrófagos e neutrófilos que atuam contra antígenos bacterianos, aumentando a concentração local de produtos microbianos, como o LPS e o ácido teicóico. Sabe-se que o LPS é um dos responsáveis pela patogenicidade bacteriana e que, ao se ligar ao receptor CD14 localizado em monócitos e macrófagos, induz a liberação de citocinas que causam reabsorção óssea (IL-1 β e TNF- α) (FIERRO *et al.* 1999, GYURKO *et al.* 2005, WEI *et al.* 1995).

A progressão da lesão periapical está relacionada com dois eventos: o primeiro é a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α juntamente com a migração celular. O segundo evento relaciona-se à diferenciação de osteoclastos e, por extensão, à reabsorção óssea. Neste estudo, avaliou-se o padrão da expressão do mRNA de citocinas e quimiocinas relevantes para o desenvolvimento dessas lesões em camundongos *iNOS*^{-/-}. Observou-se um aumento nos níveis da expressão de IL-1 β e TNF- α nos tecidos perirradiculares dos camundongos deficientes da *iNOS*. Estas citocinas são responsáveis por ativar mecanismos microbicidas no hospedeiro e assim, na ausência da *iNOS*, sua maior expressão pode se relacionar a um aumento na concentração de antígenos nestes sítios. Ademais, estas citocinas são importantes fatores de reabsorção óssea (STASHENKO *et al.* 1987, WANG e STASHENKO 1993, STASHENKO *et al.* 1992). Sua

maior expressão aqui observada também guarda relação com o maior desenvolvimento destas lesões nesses animais.

Devido ao fato de o infiltrado inflamatório da lesão periapical ser maior nos animais *iNOS*^{-/-}, avaliou-se a expressão da quimiocina MCP-1. O MCP-1 é um dos principais fatores inflamatórios encontrados em granulomas periapicais humanos, sendo expresso, em grande parte, por células epiteliais. Essa citocina participa do recrutamento de monócitos, leucócitos e macrófagos (KABASHIMA *et al.* 2001, MARTON *et al.* 2000, SILVA *et al.* 2005). Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que os camundongos *iNOS*^{-/-} têm os níveis mais elevados do mRNA dessa quimiocina quando comparados com o *PHOX*^{-/-} e o selvagem nos tecidos perirradiculares, o que sugere que a produção de NO influencia a expressão gênica da quimiocina MCP-1. Estes resultados são confirmados por aqueles que demonstraram a modulação das quimiocinas pelo óxido nítrico (DESAI *et al.* 2003, FUKADA *et al.* 2008). Em modelo similar de lesão perirradicular induzida em camundongos, viu-se que os animais deficientes da *iNOS* expressaram níveis elevados da quimiocina SDF-1 α (fator derivado das células do estroma 1 α), responsável pela mobilização de células precursoras dos osteoclastos do espaço intravascular para o espaço tecidual (FUKADA *et al.* 2008). Além disso, estudos prévios, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, tornaram evidente que a inibição da *iNOS* promove a expressão de MCP-1 pelas células endoteliais em um modelo murino de doença pulmonar e por miócitos da linhagem C2C12 tratados com LPS (KAWANISHI *et al.* 2008, DESAI *et al.* 2003). Diante desses resultados, pode-se inferir que a deficiência da *iNOS* e, conseqüentemente, a redução na produção do NO, aumentam a expressão do MCP-1, o que favoreceria a migração de monócitos e linfócitos para a lesão periapical.

Durante o desenvolvimento das lesões perirradiculares, a reabsorção óssea é mediada por diversos fatores que influenciarão tanto o número quanto a atividade dos

osteoclastos (WADA *et al.* 2006). O óxido nítrico é um poderoso mediador da osteoclastogênese, visto que ele participa do recrutamento, formação, função e sobrevivência dessas células (LIN *et al.* 2003, RALSTON 1997). Curiosamente, sua participação acontece de forma dicotômica: o NO tanto pode induzir quanto inibir a diferenciação dos osteoclastos e a reabsorção óssea (RALSTON *et al.* 1995, CHOLE *et al.* 1998, VAN'T HOF e RALSTON 2001). Por exemplo, em modelos animais de osteoporose induzida pela remoção dos ovários, foi demonstrado que o NO é um dos mediadores envolvidos na perda óssea, uma vez que grupos que foram tratados com inibidores da iNOS não apresentaram nem redução na densidade óssea, nem aumento no número de osteoclastos. Por sua vez, o grupo que não foi tratado teve menor densidade óssea e acréscimo no número de osteoclastos (CUZZOCREA *et al.* 2003). Em contrapartida, a inibição da atividade da iNOS pode otimizar a formação de osteoclastos a partir de células da medula óssea, bem como gerar uma maior reabsorção óssea em culturas de células da calvária de camundongos (HOLLIDAY *et al.* 1997). Os resultados do nosso estudo estão coerentes com esses achados, uma vez que os camundongos iNOS^{-/-} apresentaram um maior número de osteoclastos nas lesões perirradiculares que os demais avaliados, sugerindo que o NO modularia negativamente a diferenciação destas células.

Segundo Fan *et al.* (2004), o NO pode também participar da osteoclastogênese diminuindo a expressão de RANKL e aumentando a expressão de OPG nas células estromais da medula óssea. Em doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide e a periodontite, a ativação de osteoclastos é mediada pela produção de RANK, RANKL e menor produção de OPG (CROTTI *et al.* 2003, HAYNES *et al.* 2001, VERNAL *et al.* 2006a). Em nosso estudo, observamos que o aumento da reabsorção óssea e do número de osteoclastos no camundongo iNOS^{-/-} não se correlacionou com a expressão de OPG, mas

sim, com a maior expressão de RANK e RANKL. Da mesma maneira, estudos anteriores demonstraram que a deficiência da iNOS está relacionada com maior reabsorção óssea periapical, bem como uma maior expressão de RANKL, RANK e maior formação dos osteoclastos (FUKADA *et al.* 2008). Por sua vez, não observamos diferença na expressão de OPG entre os grupos avaliados, ao passo que os autores acima comprovaram menor expressão gênica da osteoprotegerina na lesão periapical induzida em animais iNOS^{-/-} (FUKADA *et al.* 2008). De maneira similar ao que foi observado por aqueles autores, doadores do óxido nítrico aumentam a expressão de OPG em células da medula óssea, inibindo a diferenciação de osteoclastos (FAN *et al.* 2004, WANG *et al.* 2004).

A ausência de NO não apenas permite maior expressão de RANKL, como não interfere em sua ação. Pesquisadores demonstraram a ocorrência de um *feedback* negativo durante a osteoclastogênese, mediado por NO: pré-osteoclastos da linhagem RAW 264.7, quando estimulados com RANKL, produzem NO que, por sua vez, inibe a osteoclastogênese iniciada pelo RANKL (ZHENG *et al.* 2006). Relacionando este mecanismo com os resultados obtidos em nosso estudo, poder-se-ia inferir que o aumento no número de osteoclastos estaria relacionado à ausência da produção de NO nos animais iNOS^{-/-}, não havendo uma regulação negativa na diferenciação dos osteoclastos. Em desacerto com o que foi observado em nossas investigações, outros pesquisadores demonstraram que ratos tratados com L-NMMA, um inibidor da iNOS, apresentaram menor área de reabsorção óssea na lesão periapical quando comparados aos animais não tratados (LIN *et al.* 2007). Estes resultados conflitantes podem se dever à forma de inibição da iNOS: o uso dos inibidores farmacológicos da iNOS não garante que a enzima esteja completamente inativada, além do que o animal poderá produzir determinada quantidade do óxido nítrico.

Os membros da família PHOX são importantes na geração de ROS que, por sua vez, são relevantes na resposta imune inata como um agente microbicida produzido pelos fagócitos (DAVIES 1995). ROS participam da resposta imune inata e da reabsorção óssea tanto na solubilização da matriz óssea quanto na diferenciação dos osteoclastos (HA *et al.* 2004,FRASER *et al.* 1996,BAX *et al.* 1992). A diferenciação dos osteoclastos relaciona-se à produção de radical superóxido pela NADPH oxidase, que participa da sinalização intracelular mediada por RANKL (SASAKI *et al.* 2009a,SASAKI *et al.* 2009b,YANG *et al.* 1998,HA *et al.* 2004). Ainda assim, pouco se sabe sobre a importância da NADPH oxidase na osteoclastogênese.

Para avaliar a participação das ROS na patogênese da lesão periapical, utilizamos o animal deficiente do gene da cadeia gp91 da NADPH oxidase. Nestes camundongos, a lesão periapical foi semelhante à do grupo controle. Entretanto, não encontramos qualquer osteoclasto na lesão periapical. Experimentos com células da medula óssea tratadas com um agente antioxidante, N-acetil cisteína, antes do tratamento com RANKL, mostraram que não houve a expressão dos mediadores intracelulares importantes para a diferenciação osteoclástica, havendo redução no número de osteoclastos (LEE *et al.* 2005). Estes resultados foram confirmados por outros autores que trataram células da medula óssea de camundongos com homocisteína e observaram que a concentração intracelular de ROS aumentou bem como a expressão da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) e beta-3 integrina (moléculas importantes para a osteoclastogênese) (KOH *et al.* 2006). Assim, o número de osteoclastos também aumentou. Para certificar-se de que esses efeitos eram resultado da produção de ROS, os autores pré-trataram as células com o agente antioxidante N-acetil cisteína e observaram que todos os efeitos da homocisteína foram anulados. Entretanto, Lee *et al.* (2005) e Koh *et al.* (2006) não identificaram qual das espécies reativas de oxigênio seria a chave para a diferenciação

dos osteoclastos. Para responder a essa questão, Fraser *et al.* (1996) e Bax *et al.* (1992) mostraram em experimentos realizados *in vitro* que o peróxido de hidrogênio, produzido a partir do radical superóxido, é capaz de estimular a reabsorção óssea, bem como a motilidade dos osteoclastos. Além disto, as espécies reativas de oxigênio induzem as vias intracelulares, essenciais para a diferenciação dos osteoclastos. No trabalho de Sasaki *et al.* (2009) comprovou-se que a inibição da atividade da PHOX (p22^{phox}) reduziu a expressão do fator nuclear de células T ativadas (NFATc1), que é um notável indutor da transcrição de genes relacionados com a formação dos osteoclastos.

O fato de não encontrarmos osteoclastos tanto na região periapical quanto em todo o tecido periodontal nos animais PHOX^{-/-} pode estar relacionado com a deficiência na produção de superóxido e peróxido de hidrogênio, que são moléculas vitais para a expressão de mediadores intracelulares essenciais para a osteoclastogênese. Entretanto, não encontramos na literatura dados sobre a reabsorção óssea periapical nesses animais.

O radical superóxido produzido pela NADPH oxidase altera a migração leucocitária para o sítio inflamatório. A razão disso é que ele gera outras espécies reativas, como peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, que têm efeito sobre a migração celular, sem falar na ação microbicida na explosão respiratória de fagócitos (VAZQUEZ-TORRES *et al.* 2000, NATHAN e SHILOH 2000). Sendo assim, a deficiência da atividade da NADPH oxidase resulta na maior susceptibilidade contra infecções bacterianas, levando a um maior recrutamento de leucócitos (MORGENSTERN *et al.* 1997, POLLOCK *et al.* 1995, GAO *et al.* 2002).

Por exemplo, a redução da produção de superóxido está relacionada com o aumento do infiltrado leucocitário no peritônio de camundongos após tratamento com tioglicolato. Ademais, a geração de superóxido contribui para a migração de

polimorfonucleares no tecido pulmonar (POLLOCK *et al.* 1995, JACKSON *et al.* 1995). Estes autores verificaram o recrutamento e a migração transalveolar de polimorfonucleares em animais p47^{phox}^{-/-} e gp91^{phox}^{-/-} após o desafio com *Escherichia coli*. Eles também deixaram claro que a deficiência da NADPH oxidase aumenta o número de bactérias no tecido pulmonar, o que foi um fator crítico para a ativação e liberação de quimiocinas.

Os nossos resultados mostraram que a NADPH oxidase não é um fator tão relevante quanto a óxido nítrico sintase indutível no modelo de indução da lesão periapical, uma vez que o infiltrado inflamatório, o tamanho da lesão e a expressão das citocinas avaliadas foram diferentes entre os camundongos PHOX^{-/-} e iNOS^{-/-}, mas foram iguais entre o PHOX^{-/-} e C57BL/6 selvagem. Esses resultados nos fazem supor que a iNOS, mas não a NADPH oxidase, seja elemento-chave para mediar a resposta inflamatória contra possíveis microorganismos e seus subprodutos, tais como o LPS, nas lesões periapicais uma vez que, no animal PHOX^{-/-}, as características da lesão eram semelhantes às do camundongo C57BL/6 selvagem. Essa suposição está de acordo com outros trabalhos que demonstraram a importância da ligação de diferentes antígenos aos receptores do tipo *Toll* para a indução da produção de óxido nítrico, e que a expressão de TLR4 após estimulação com IFN- γ e LPS de *Helicobacter pilory* é dependente da produção de óxido nítrico (HE *et al.* 2007, UNO *et al.* 2007).

Entretanto, diferentes autores mostraram resultados distintos do nosso trabalho. Lin *et al.* (2006) afirmaram que a atividade da NADPH oxidase é fundamental para a expressão de TLR4 mediada por LPS em células musculares da aorta humana. Já outros autores comprovaram a importância das ROS na produção de citocinas pró-inflamatórias pelos neutrófilos humanos (ASEHNOUNE *et al.* 2004). Eles demonstraram que o tratamento dessas células com LPS induz a translocação do Fator Nuclear Kappa B

(NF- κ B) para o núcleo, cuja sinalização estimula diferentes respostas nos neutrófilos. Entretanto, se os neutrófilos eram previamente tratados com os antioxidantes N-acetil cisteína e alfa-tocoferol, não ocorria a translocação do NF- κ B para o núcleo, tampouco a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α ou a proteína inflamatória do macrófago 2 (MIP-2) (ASEHNOUNE *et al.* 2004). Entre as espécies reativas de oxigênio, o peróxido de hidrogênio é aquele que mais exerce influência na translocação do NF- κ B para o núcleo (JANSSEN-HEININGER *et al.* 2000, PIETTE *et al.* 1997). Mediante isso, podemos deduzir que no modelo de lesão periapical utilizado nesse estudo, os microorganismos e seus produtos que egressam do canal radicular nos animais C57BL/6 selvagens e PHOX^{-/-} podem interagir com receptores da resposta imune inata, induzindo a expressão da iNOS e a produção de NO, e controlando o processo infeccioso. Uma vez que as espécies reativas de oxigênio cumprem papel central na resistência contra infecções bacterianas, mais estudos precisarão ser realizados para comprovar que as ROS não são moléculas fundamentais para o combate contra a infecção endodôntica.

Já se sabe que o sistema imune tem estreita relação com a modulação óssea pelo fato de terem moléculas regulatórias em comum. A ativação do sistema imune durante a infecção endodôntica causa destruição óssea alveolar. Os linfócitos T ativados possuem um efeito na destruição óssea de maneira indireta, estimulando macrófagos a secretarem citocinas pró-inflamatórias, as quais induzem a expressão de RANKL por osteoblastos e linfócitos B. Eles possuem também um efeito direto, expressando mRANKL, sRANKL e RANK (KAWAI *et al.* 2007, TAUBMAN e KAWAI 2001). Nossos resultados comprovaram que os linfócitos T são a principal fonte de mRANKL na lesão periapical e na medula óssea do osso alveolar. Esses resultados indicam que a perda óssea adjacente à lesão periapical pode ser regulada pela atividade dos linfócitos T

através da expressão de mRANKL e que essas células migram do espaço medular para a lesão periapical.

Observou-se que 3 e 7 dias após a indução da lesão experimental já existiam linfócitos T expressando mRANKL no espaço medular, que não são mais encontradas na lesão após 14 dias. As células apresentadoras de antígenos presentes nos tecidos perirradiculares migram para o linfonodo regional e ativam linfócitos T, que começam a expressar mRANKL (KANEKO *et al.* 2001). A microscopia confocal permitiu que se identificassem estas células em seu caminho em direção à região perirradicular, ainda na medula óssea. Pelo observado na literatura, este é o primeiro estudo a demonstrar a presença destas células (linfócitos T mRANKL⁺) nos tecidos perirradiculares de camundongos. Outros pesquisadores já haviam demonstrado a presença de linfócitos T nas lesões periapicais, sugerindo que tais células devem ser importantes no controle da disseminação da infecção endodôntica (LIAPATAS *et al.* 2003, TELES *et al.* 1997).

Observou-se que a presença de linfócitos T mRANKL⁺ foi detectadas, em todos os tempos operatórios, na medula óssea alveolar. No 3^o dia após a indução das lesões, aproximadamente 50% dos linfócitos T presentes no espaço medular estavam expressando mRANKL. Tal fato indica que nos estágios iniciais da formação da lesão perirradicular, estas células ativadas já se encontravam se dirigindo para a região periapical.

Detectou-se que células periostina⁺ podem expressar mRANKL. Tais células podem ser fibroblastos e osteoblastos. Não há na literatura qualquer trabalho que descreva a expressão de mRANKL por essas células na lesão periapical. É interessante notar que as células periostina⁺ parecem responder à presença do antígeno bacteriano uma vez que a expressão de mRANKL foi detectada apenas nos camundongos que tiveram a polpa exposta. Isso nos faz supor que não apenas o linfócito T, mas os

fibroblastos e osteoblasto podem participar da diferenciação inicial dos precursores dos osteoclastos na lesão periapical.

6 Conclusões

Pode-se observar que:

1. O modelo de indução de lesão de furca se mostrou útil para a padronização dos cortes utilizados no estudo das alterações perirradiculares em camundongos.
2. A maior reabsorção óssea observada nos camundongos iNOS^{-/-} está relacionada ao aumento das citocinas pró-inflamatórias e ao aumento no número de osteoclastos na lesão periapical.
3. O aumento na expressão de MCP-1 devido à deficiência da iNOS está relacionado com o aumento na migração de células para a região periapical.
4. A NADPH oxidase parece não ser um fator tão importante quanto a óxido nítrico sintase na resistência do hospedeiro contra a infecção, já que o perfil de citocinas e as características histológicas foram semelhantes tanto no animal PHOX^{-/-} quanto no C57BL/6.
5. Como demonstrado na análise da microscopia confocal, o mRANKL é expresso por linfócitos T, fibroblastos e osteoblastos nos momentos iniciais da formação da lesão periapical. Sendo assim, é possível que essas células sejam as responsáveis pela diferenciação inicial dos precursores dos osteoclastos recrutados para a lesão.

Concluiu-se que:

O óxido nítrico é importante na resistência contra antígenos bacterianos na lesão periapical. Sua ausência causa o aumento do infiltrado inflamatório e da reabsorção óssea perirradicular, devido ao aumento na expressão das citocinas

pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , bem como da quimiocina MCP-1 e dos mediadores da osteoclastogênese, RANK e RANKL.

Referências Bibliográficas

1. ALAYAN J, IVANOVSKI S, GEMMELL E, FORD P, HAMLET S e FARAH CS. Deficiency of iNOS contributes to *Porphyromonas gingivalis*-induced tissue damage. *Oral Microbiol Immunol*, v. 21, n.6, p. 360-365, **2006**.
2. ALEXANDER J, SCHARTON-KERSTEN TM, YAP G, ROBERTS CW, LIEW FY e SHER A. Mechanisms of innate resistance to *Toxoplasma gondii* infection. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci*, v. 352, n.1359, p. 1355-1359, **1997**.
3. ANDERSON DM, MARASKOVSKY E, BILLINGSLEY WL, DOUGALL WC, TOMETSKO ME, ROUX ER, TEEPE MC, DUBOSE RF, COSMAN D e GALIBERT L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, v. 390, n.6656, p. 175-179, **1997**.
4. ASEHNOUNE K, STRASSHEIM D, MITRA S, KIM JY e ABRAHAM E. Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B. *J Immunol*, v. 172, n.4, p. 2522-2529, **2004**.
5. ASMAN B, BERGSTROM K. Expression of Fc-gamma-RIII and fibronectin in peripheral polymorphonuclear neutrophils with increased response to Fc stimulation in patients with juvenile periodontitis. *Arch Oral Biol*, v. 37, n.12, p. 991-995, **1992**.
6. ASSREUY J, CUNHA FQ, EPPERLEIN M, NORONHA-DUTRA A, O'DONNELL CA, LIEW FY e MONCADA S. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *Eur J Immunol*, v. 24, n.3, p. 672-676, **1994**.
7. BABIOR BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*, v. 93, n.5, p. 1464-1476, **1999**.
8. BABIOR BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*, v. 16, n.12, p. 1200-1204, **2004**.
9. BAE YS, KANG SW, SEO MS, BAINES IC, TEKLE E, CHOCK PB e RHEE SG. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, v. 272, n.1, p. 217-221, **1997**.

10. BAIK JE, RYU YH, HAN JY, IM J, KUM KY, YUN CH, LEE K e HAN SH. Lipoteichoic acid partially contributes to the inflammatory responses to *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics*, v. 34, n.8, p. 975-982, **2008**.
11. BARBOSA LGM. Expressão de citocinas inflamatórias e quimiocinas no tecido cardíaco de pacientes com Cardiomiopatia Chagásica Crônica., p. 1-229. Tese de doutorado em Ciências Biológicas - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, **2008**.
12. BAX BE, ALAM AS, BANERJI B, BAX CM, BEVIS PJ, STEVENS CR, MOONGA BS, BLAKE DR e ZAIDI M. Stimulation of osteoclastic bone resorption by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 183, n.3, p. 1153-1158, **1992**.
13. BEDARD K, KRAUSE KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, v. 87, n.1, p. 245-313, **2007**.
14. BLOCK RM, BUSHELL A, RODRIGUES H e LANGELAND K. A histopathologic, histobacteriologic, and radiographic study of periapical endodontic surgical specimens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 42, n.5, p. 656-678, **1976**.
15. BOGDAN C, RALLINGHOFF M e DIEFENBACH A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev*, v. 173, p. 17-26, **2000**.
16. BOYLE WJ, SIMONET WS e LACEY DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, v. 423, n.6937, p.337-341, **2003**.
17. BREDT DS, SNYDER SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U. S. A*, v. 87, n.2, p. 682-685, **1990**.
18. BROWNER WS, LUI LY e CUMMINGS SR. Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 86, n.2, p. 631-637, **2001**.
19. CARMIGNANI M, VOLPE AR, BOSCOLO P, QIAO N, DI GM, GRILLI A e FELACO M. Catcholamine and nitric oxide systems as targets of chronic lead exposure in inducing selective functional impairment. *Life Sci*, v. 68, n.4, p. 401-415, **2000**.
20. CHAE P, IM M, GIBSON F, JIANG Y e GRAVES DT. Mice lacking monocyte chemoattractant protein 1 have enhanced susceptibility to an interstitial polymicrobial infection due to impaired monocyte recruitment. *Infect Immun*, v. 70, n.6, p. 3164-3169, **2002**.

21. CHOLE RA, TINLING SP, LEVERENTZ E e MCGINN MD. Inhibition of nitric oxide synthase blocks osteoclastic bone resorption in adaptive bone modeling. *Acta Otolaryngol*, v. 118, n.5, p. 705-711, **1998**.
22. COCHRAN DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*, v. 79, n.8 Suppl, p. 1569-1576, **2008**.
23. CROTTI T, SMITH MD, HIRSCH R, SOUKOULIS S, WEEDON H, CAPONE M, AHERN MJ e HAYNES D. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontal Res*, v. 38, n.4, p. 380-387, **2003**.
24. CUZZOCREA S, MAZZON E, DUGO L, GENOVESE T, DI PAOLA R, RUGGERI Z, VEGETO E, CAPUTI AP, VAN DE LOO FAJ, PUZZOLO D e MAGGI A. Inducible nitric oxide synthase mediates bone loss in ovariectomized mice. *Endocrinology*, v. 144, n.3, p. 1098-1107, **2003**.
25. DAVIES KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp*, v. 61, p. 1-31, **1995**.
26. DE DEUS QD. Endodontia., 5ª ed. Medsi. p. -501, **1992**.
27. DESAI A, MILLER MJ, HUANG X e WARREN JS. Nitric oxide modulates MCP-1 expression in endothelial cells: implications for the pathogenesis of pulmonary granulomatous vasculitis. *Inflammation*, v. 27, n.4, p. 213-223, **2003**.
28. DEWHIRST FE, STASHENKO PP, MOLE JE e TSURUMACHI T. Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identity with interleukin 1 beta. *J Immunol*, v. 135, n.4, p. 2562-2568, **1985**.
29. DIEFENBACH A, SCHINDLER H, DONHAUSER N, LORENZ E, LASKAY T, MACMICKING J, RALLINGHOFF M, GRESSER I e BOGDAN C. Type 1 interferon (IFNalpha/beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity*, v. 8, n.1, p. 77-87, **1998**.
30. DINARELLO CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, v. 87, n.6, p. 2095-2147, **1996**.
31. FAN X, ROY E, ZHU L, MURPHY TC, CKERT-BICKNELL C, HART CM, ROSEN C, NANES MS e RUBIN J. Nitric oxide regulates receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin expression in bone marrow stromal cells. *Endocrinology*, v. 145, n.2, p. 751-759, **2004**.

32. FIERRO IM, NASCIMENTO-DASILVA V, ARRUDA MA, FREITAS MS, PLOTKOWSKI MC, CUNHA FQ e BARJA-FIDALGO C. Induction of NOS in rat blood PMN in vivo and in vitro: modulation by tyrosine kinase and involvement in bactericidal activity. *J Leukoc Biol*, v. 65, n.4, p. 508-514, **1999**.
33. FOUAD AF, ACOSTA AW. Periapical lesion progression and cytokine expression in an LPS hyporesponsive model. *Int Endod J*, v. 34, n.7, p. 506-513, **2001**.
34. FRASER JH, HELFRICH MH, WALLACE HM e RALSTON SH. Hydrogen peroxide, but not superoxide, stimulates bone resorption in mouse calvariae. *Bone*, v. 19, n.3, p. 223-226, **1996**.
35. FUKADA SY, SILVA TA, SACONATO IF, GARLET GP, VILA-CAMPOS MJ, SILVA JS e CUNHA FQ. iNOS-derived nitric oxide modulates infection-stimulated bone loss. *J Dent Res*, v. 87, n.12, p. 1155-1159, **2008**.
36. FULLER K, GALLAGHER AC e CHAMBERS TJ. Osteoclast resorption-stimulating activity is associated with the osteoblast cell surface and/or the extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 181, n.1, p. 67-73, **1991**.
37. GAO Xp, STANDIFORD TJ, RAHMAN A, NEWSTEAD M, HOLLAND SM, DINAUER MC, LIU Qh e MALIK AB. Role of NADPH oxidase in the mechanism of lung neutrophil sequestration and microvessel injury induced by Gram-negative sepsis: studies in p47phox^{-/-} and gp91phox^{-/-} mice. *J Immunol*, v. 168, n.8, p. 3974-3982, **2002**.
38. GARDNER PR, FRIDOVICH I. Superoxide sensitivity of the Escherichia coli aconitase. *J Biol Chem*, v. 266, n.29, p. 19328-19333, **1991**.
39. GARLET GP, MARTINS W, FERREIRA BR, MILANEZI CM e SILVA JoS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodont Res*, v. 38, n.2, p. 210-217, **2003**.
40. GARRETT IR, BOYCE BF, OREFFO RO, BONEWALD L, POSER J e MUNDY GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest*, v. 85, n.3, p. 632-639, **1990**.
41. GHOSH S, GOSWAMI S e ADHYA S. Role of superoxide dismutase in survival of Leishmania within the macrophage. *Biochem J*, v. 369, n.Pt 3, p. 447-452, **2003**.
42. GYURKO R, SHOJI H, BATTAGLINO RA, BOUSTANY G, GIBSON FC, GENCO CA, STASHENKO P e VAN DYKE TE. Inducible nitric oxide synthase mediates bone

- development and *P. gingivalis*-induced alveolar bone loss. *Bone*, v. 36, n.3, p. 472-479, **2005**.
43. HA H, KWAK HB, LEE SW, JIN HM, KIM HM, KIM HH e LEE ZH. Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclasts. *Exp Cell Res*, v. 301, n.2, p. 119-127, **2004**.
44. HAYNES DR, CROTTI TN, LORIC M, BAIN GI, ATKINS GJ e FINDLAY DM. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclast formation by cells in the human rheumatoid arthritic joint. *Rheumatology (Oxford)*, v. 40, n.6, p. 623-630, **2001**.
45. HE H, GENOVESE KJ, NISBET DJ e KOGUT MH. Synergy of CpG oligodeoxynucleotide and double-stranded RNA (poly I:C) on nitric oxide induction in chicken peripheral blood monocytes. *Mol Immunol*, v. 44, n.12, p. 3234-3242, **2007**.
46. HEYWORTH PG, CROSS AR e CURNUTTE JT. Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol*, v. 15, n.5, p. 578-584, **2003**.
47. HILL PA. Bone remodelling. *British journal of orthodontics*, v. 25, n.2, p. 101-107, **1998**.
48. HOLLIDAY LS, DEAN AD, LIN RH, GREENWALD JE e GLUCK SL. Low NO concentrations inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures by cGMP-dependent mechanism. *Am J Physiol*, v. 272, n.3 Pt 2, p. F283-F291, **1997**.
49. HONG CY, LIN SK, KOK SH, CHENG SJ, LEE MS, WANG TM, CHEN CS, LIN LD e WANG JS. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med*, v. 33, n.3, p. 162-169, **2004**.
50. HUGHES DE, DAI A, TIFFEE JC, LI HH, MUNDY GR e BOYCE BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med*, v. 2, n.10, p. 1132-1136, **1996**.
51. INOUE J, ISHIDA T, TSUKAMOTO N, KOBAYASHI N, NAITO A, AZUMA S e YAMAMOTO T. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp Cell Res*, v. 254, n.1, p. 14-24, **2000**.
52. JACKSON SH, GALLIN JI e HOLLAND SM. The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease. *J Exp Med*, v. 182, n.3, p. 751-758, **1995**.

-
53. JANSSEN-HEININGER YM, POYNTER ME e BAEUERLE PA. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic Biol Med*, v. 28, n.9, p. 1317-1327, **2000**.
54. JOSIEN R, LI HL, INGULLI E, SARMA S, WONG BR, VOLOGODSKAIA M, STEINMAN RM e CHOI Y. TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *J Exp Med*, v. 191, n.3, p. 495-502, **2000**.
55. KABASHIMA H, YONEDA M, NAGATA K, HIROFUJI T, ISHIHARA Y, YAMASHITA M e MAEDA K. The presence of chemokine receptor (CCR5, CXCR3, CCR3)-positive cells and chemokine (MCP1, MIP-1alpha, MIP-1beta, IP-10)-positive cells in human periapical granulomas. *Cytokine*, v. 16, n.2, p. 62-66, **2001**.
56. KANEKO T, OKIJI T, KAN L, TAKAGI M e SUDA H. Ultrastructural analysis of MHC class II molecule-expressing cells in experimentally induced periapical lesions in the rat. *J Endod*, v. 27, n.5, p. 337-342, **2001**.
57. KARIMA M, KANTARCI A, OHIRA T, HASTURK H, JONES VL, NAM BH, MALABANAN A, TRACKMAN PC, BADWEY JA e VAN DYKE TE. Enhanced superoxide release and elevated protein kinase C activity in neutrophils from diabetic patients: association with periodontitis. *J Leukoc Biol*, v. 78, n.4, p. 862-870, **2005**.
58. KAWAI T, PASTER BJ, KOMATSUZAWA H, ERNST CWO, GONCALVES RB, SASAKI H, OUHARA K, STASHENKO PP, SUGAI M e TAUBMAN MA. Cross-reactive adaptive immune response to oral commensal bacteria results in an induction of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL)-dependent periodontal bone resorption in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol*, v. 22, n.3, p. 208-215, **2007**.
59. KAWAI T, SEKI M, HIROMATSU K, EASTCOTT JW, WATTS GF, SUGAI M, SMITH DJ, PORCELLI SA e TAUBMAN MA. Selective diapedesis of Th1 cells induced by endothelial cell RANTES. *J Immunol*, v. 163, n.6, p. 3269-3278, **1999**.
60. KAWANISHI N, TANAKA Y, KATO Y, SHIVA D e YANO H. Lipopolysaccharide-induced monocyte chemotactic protein-1 is enhanced by suppression of nitric oxide production, which depends on poor CD14 expression on the surface of skeletal muscle. *Cell Biochem Funct*, v. 26, n.4, p. 486-492, **2008**.
61. KAWASHIMA N, OKIJI T, KOSAKA T e SUDA H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. *Journal of endodontics*, v. 22, n.6, p. 311-316, **1996**.

62. KAWASHIMA N, SUZUKI N, YANG G, OHI C, OKUHARA S, NAKANO-KAWANISHI H e SUDA H. Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, v. 103, n.5, p. 707-711, **2007**.
63. KEY LL, RIES WL, TAYLOR RG, HAYS BD e PITZER BL. Oxygen derived free radicals in osteoclasts: the specificity and location of the nitroblue tetrazolium reaction. *Bone*, v. 11, n.2, p. 115-119, **1990**.
64. KHOSLA S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*, v. 142, n.12, p.5050-5055, **2001**.
65. KIKKAWA I, SAITO S, TOMINAGA K, HOSHINO Y, OOI Y e NAKANO M. Lipopolysaccharide (LPS) stimulates the production of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by osteoclasts (OCL) in murine bone marrow cell culture. *Microbiol Immunol*, v. 42, n.9, p. 591-598, **1998**.
66. KOH JM, LEE YS, KIM YS, KIM DJ, KIM HH, PARK JY, LEE KU e KIM GS. Homocysteine enhances bone resorption by stimulation of osteoclast formation and activity through increased intracellular ROS generation. *J. Bone Miner. Res.*, v. 21, n.7, p. 1003-1011, **2006**.
67. KUBES P. Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. *Gut*, v. 47, n.1, p. 6-9, **2000**.
68. LAMBETH JD, KAWAHARA T e DIEBOLD B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic Biol Med*, v. 43, n.3, p. 319-331, **2007**.
69. LANDER HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J*, v. 11, n.2, p. 118-124, **1997**.
70. LEE NK, CHOI YG, BAIK JY, HAN SY, JEONG DW, BAE YS, KIM N e LEE SY. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood*, v. 106, n.3, p. 852-859, **2005**.
71. LEIBBRANDT A, PENNINGER JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1143, p. 123-150, **2008**.

72. LERNER UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res*, v. 85, n.7, p. 596-607, **2006**.
73. LIAPATAS S, NAKOU M e RONTOGIANNI D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J*, v. 36, n.7, p. 464-471, **2003**.
74. LIM GC, TORABINEJAD M, KETTERING J, LINKHARDT TA e FINKELMAN RD. Interleukin 1-beta in symptomatic and asymptomatic human periradicular lesions. *Journal of endodontics*, v. 20, n.5, p. 225-227, **1994**.
75. LIN FY, CHEN YH, TASI JS, CHEN JW, YANG TL, WANG HJ, LI CY, CHEN YL e LIN SJ. Endotoxin induces toll-like receptor 4 expression in vascular smooth muscle cells via NADPH oxidase activation and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 26, n.12, p. 2630-2637, **2006**.
76. LIN SK, KOK SH, LIN LD, WANG CC, KUO MYP, LIN CT, HSIAO M e HONG CY. Nitric oxide promotes the progression of periapical lesion via inducing macrophage and osteoblast apoptosis. *Oral Microbiol Immunol*, v. 22, n.1, p. 24-29, **2007**.
77. LIN SK, KOK SH, KUO MY-P, LEE MS, WANG CC, LAN WH, HSIAO M, GOLDRING SR e HONG CY. Nitric oxide promotes infectious bone resorption by enhancing cytokine-stimulated interstitial collagenase synthesis in osteoblasts. *J Bone Miner Res*, v. 18, n.1, p. 39-46, **2003**.
78. MACKAY CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol*, v. 2, n.2, p. 95-101, **2001**.
79. MARTON IJ, KISS C. Influence of surgical treatment of periapical lesions on serum and blood levels of inflammatory mediators. *Int Endod J*, v. 25, n.5, p. 229-233, **1992**.
80. MARTON IJ, ROT A, SCHWARZINGER E, RADICS T e KISS C. Differential in situ distribution of interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and Rantes in human chronic periapical granuloma. *Oral Microbiol Immunol*, v. 15, n.1, p. 63-65, **2000**.
81. MATSUSHITA K, TAJIMA T, TOMITA K, TAKADA H, NAGAOKA S e TORII M. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses to lipopolysaccharide from endodontopathic black-pigmented bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis. *Journal of endodontics*, v. 25, n.12, p. 795-799, **1999**.

-
82. MATTHEWS JB, WRIGHT HJ, ROBERTS A, COOPER PR e CHAPPLE ILC. Hyperactivity and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis. *Clin Exp Immunol*, v. 147, n.2, p. 255-264, **2007**.
83. MENZIES-GOW A, YING S, SABROE I, STUBBS VL, SOLER D, WILLIAMS TJ e KAY AB. Eotaxin (CCL11) and eotaxin-2 (CCL24) induce recruitment of eosinophils, basophils, neutrophils, and macrophages as well as features of early- and late-phase allergic reactions following cutaneous injection in human atopic and nonatopic volunteers. *J Immunol*, v. 169, n.5, p. 2712-2718, **2002**.
84. MIN JK, CHO YL, CHOI JH, KIM Y, KIM JH, YU YS, RHO J, MOCHIZUKI N, KIM YM, OH GT e KWON YG. Receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand (RANKL) increases vascular permeability: impaired permeability and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Blood*, v. 109, n.4, p. 1495-1502, **2007**.
85. MIZUNO A, KANNO T, HOSHI M, SHIBATA O, YANO K, FUJISE N, KINOSAKI M, YAMAGUCHI K, TSUDA E, MURAKAMI A, YASUDA H e HIGASHIO K. Transgenic mice overexpressing soluble osteoclast differentiation factor (sODF) exhibit severe osteoporosis. *J Bone Miner Metab*, v. 20, n.6, p. 337-344, **2002**.
86. MORGENSTERN DE, GIFFORD MA, LI LL, DOERSCHUK CM e DINAUER MC. Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatous disease mice leads to abnormalities in both host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus*. *J Exp Med*, v. 185, n.2, p. 207-218, **1997**.
87. MOSER B, LOETSCHER P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol*, v. 2, n.2, p. 123-128, **2001**.
88. MOUGHAL NA, ADONOGIANAKI E, THORNHILL MH e KINANE DF. Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in gingival tissue during health and experimentally-induced gingivitis. *J Periodont Res*, v. 27, n.6, p. 623-630, **1992**.
89. NAIR PN. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol 2000*, v. 13, p. 121-148, **1997**.
90. NAIR PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 15, n.6, **2004**.
91. NAIR SP, MEGHJI S, WILSON M, REDDI K, WHITE P e HENDERSON B. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infect Immun*, v. 64, n.7, p. 2371-2380, **1996**.

-
92. NAKASHIMA T, KOBAYASHI Y, YAMASAKI S, KAWAKAMI A, EGUCHI K, SASAKI H e SAKAI H. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 275, n.3, p. 768-775, **2000**.
93. NATHAN C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*, v. 6, n.12, p. 3051-3064, **1992**.
94. NATHAN C, SHILOH MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 97, n.16, p. 8841-8848, **2000**.
95. NORMAN MU, ZBYTNUIK L e KUBES P. Interferon-gamma limits Th1 lymphocyte adhesion to inflamed endothelium: a nitric oxide regulatory feedback mechanism. *Eur J Immunol*, v. 38, n.5, p. 1368-1380, **2008**.
96. PIETTE J, PIRET B, BONIZZI G, SCHOONBROODT S, MERVILLE MP, LEGRAND-POELS S e BOURS V. Multiple redox regulation in NF-kappaB transcription factor activation. *Biol Chem*, v. 378, n.11, p. 1237-1245, **1997**.
97. POLLOCK JD, WILLIAMS DA, GIFFORD MA, LI LL, DU X, FISHERMAN J, ORKIN SH, DOERSCHUK CM e DINAUER MC. Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat Genet*, v. 9, n.2, p. 202-209, **1995**.
98. RALSTON SH. The Michael Mason Prize Essay 1997. Nitric oxide and bone: what a gas! *Br J Rheumatol*, v. 36, n.8, p. 831-838, **1997**.
99. RALSTON SH, GRABOWSKI PS. Mechanisms of cytokine induced bone resorption: role of nitric oxide, cyclic guanosine monophosphate, and prostaglandins. *Bone*, v. 19, n.1, p. 29-33, **1996**.
100. RALSTON SH, HO LP, HELFRICH MH, GRABOWSKI PS, JOHNSTON PW e BENJAMIN N. Nitric oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption. *J Bone Miner Res*, v. 10, n.7, p. 1040-1049, **1995**.
101. REDDI K, WILSON M, POOLE S, MEGHJI S e HENDERSON B. Relative cytokine-stimulating activities of surface components of the oral periodontopathogenic bacterium, p.534-541. *Cytokine*, v. 7, n.6, p. 534-541, **1995**.

102. RHEE SG. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med*, v. 31, n.2, p. 53-59, **1999**.
103. RODINI CO, LARA VS. Study of the expression of CD68+ macrophages and CD8+ T cells in human granulomas and periapical cysts. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, v. 92, n.2, p. 221-227, **2001**.
104. ROSSI D, ZLOTNIK A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*, v. 18, p. 217-242, **2000**.
105. ROWE AH. Reaction of the rat molar pulp to various materials. *Br Dent J*, v. 122, n.7, p. 291-300, **1967**.
106. SALLUSTO F, BAGGIOLINI M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nat Immunol*, v. 9, n.9, p. 949-952, **2008**.
107. SASAKI H, HOU L, BELANI A, WANG CY, UCHIYAMA T, MALLER R e STASHENKO P. IL-10, but not IL-4, suppresses infection-stimulated bone resorption in vivo. *J Immunol*, v. 165, n.7, p. 3626-3630, **2000**.
108. SASAKI H, YAMAMOTO H, TOMINAGA K, MASUDA K, KAWAI T, TESHIMA-KONDO S, MATSUNO K, YABE-NISHIMURA C e ROKUTAN K. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-induced mouse osteoclast differentiation is associated with switching between NADPH oxidase homologues. *Free Radic Biol Med*, v. 47, n.2, p. 189-199, **2009a**.
109. SASAKI H, YAMAMOTO H, TOMINAGA K, MASUDA K, KAWAI T, TESHIMA-KONDO S e ROKUTAN K. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species are essential for differentiation of a mouse macrophage cell line (RAW264.7) into osteoclasts. *J Med Invest*, v. 56, n.1-2, p. 33-41, **2009b**.
110. SATTLER AM, SCHOPPET M, SCHAEFER JR e HOFBAUER LC. Novel aspects on RANK ligand and osteoprotegerin in osteoporosis and vascular disease. *Calcif Tissue Int*, v. 74, n.1, p. 103-106, **2004**.
111. SCHMALZ G, SCHWEIKL H e HILLER KA. Release of prostaglandin E2, IL-6 and IL-8 from human oral epithelial culture models after exposure to compounds of dental materials. *Eur J Oral Sci*, v. 108, n.5, p. 442-448, **2000**.
112. SCHOPPET M, SATTLER AM, SCHAEFER JR, HERZUM M, MAISCH B e HOFBAUER LC. Increased osteoprotegerin serum levels in men with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 88, n.3, p. 1024-1028, **2003a**.

113. SCHOPPET M, SCHAEFER JR e HOFBAUER LC. Low serum levels of soluble RANK ligand are associated with the presence of coronary artery disease in men. *Circulation*, v. 107, n.11, p. e76, **2003b**.
114. SHIMAUCHI H, TAKAYAMA S, IMAI-TANAKA T e OKADA H. Balance of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist in human periapical lesions. *Journal of endodontics*, v. 24, n.2, p. 116-119, **1998**.
115. SILVA MJB, CALIARI MV, SOBRINHO APR, VIEIRA LQ e ARANTES RME. An *in vivo* experimental model to assess furcal lesions as a result of perforation. *Int Endod J*, v. 42, p. 922-929, **2009**.
116. SILVA TA, GARLET GP, FUKADA SY, SILVA JS e CUNHA FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res*, v. 86, n.4, p. 306-319, **2007**.
117. SILVA TA, GARLET GP, LARA VS, MARTINS W, SILVA JS e CUNHA FQ. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *Oral Microbiol Immunol*, v. 20, n.5, p. 310-316, **2005**.
118. STASHENKO P, DEWHIRST FE, ROONEY ML, DESJARDINS LA e HEELEY JD. Interleukin-1 beta is a potent inhibitor of bone formation in vitro. *J Bone Miner Res*, v. 2, n.6, p. 559-565, **1987**.
119. STASHENKO P, TELES R e D'SOUZA R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 9, n.4, p. 498-521, **1998**.
120. STASHENKO P, WANG CY. Characterization of bone resorptive mediators in active periapical lesions. *Proceedings of the Finnish Dental Society Suomen Hammasl*, v. 88 Suppl 1, p. 427-432, **1992**.
121. STASHENKO P, WANG CY, TANI-ISHII N e YU SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 78, n.4, p. 494-502, **1994**.
122. STASHENKO P, YU SM. T helper and T suppressor cell reversal during the development of induced rat periapical lesions. *J Dent Res*, v. 68, n.5, p. 830-834, **1989**.
123. STASHENKO P, YU SM e WANG CY. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *Journal of endodontics*, v. 18, n.9, p. 422-426, **1992**.

124. SUNDQVIST G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol*, v. 7, n.5, p. 257-262, **1992**.
125. SUZUKI T, KUMAMOTO H, OOYA K e MOTEGI K. Expression of inducible nitric oxide synthase and heat shock proteins in periapical inflammatory lesions. *J Oral Pathol Med*, v. 31, n.8, p. 488-493, **2002**.
126. TAKAHASHI K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J*, v. 31, n.5, p. 311-325, **1998**.
127. TAKAYANAGI H, KIM S, MATSUO K, SUZUKI H, SUZUKI T, SATO K, YOKOCHI T, ODA H, NAKAMURA K, IDA N, WAGNER EF e TANIGUCHI T. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature*, v. 416, n.6882, p. 744-749, **2002**.
128. TAKEICHI O, SAITO I, HAYASHI M, TSURUMACHI T e SAITO T. Production of human-inducible nitric oxide synthase in radicular cysts. *Journal of endodontics*, v. 24, n.3, p. 157-160, **1998a**.
129. TAKEICHI O, SAITO I, OKAMOTO Y, TSURUMACHI T e SAITO T. Cytokine regulation on the synthesis of nitric oxide in vivo by chronically infected human polymorphonuclear leucocytes. *Immunology*, v. 93, n.2, p. 275-280, **1998b**.
130. TAUBMAN MA, KAWAI T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 12, n.2, p. 125-135, **2001**.
131. TELES R, WANG CY e STASHENKO P. Increased susceptibility of RAG-2 SCID mice to dissemination of endodontic infections. *Infect Immun*, v. 65, n.9, p. 3781-3787, **1997**.
132. TUNCER B, TUNCER C, TEOMAN I e CAKILCI B. Levels of interleukin-8 during tooth movement. *The Angle orthodontist*, v. 75, n.4, p. 631-636, **2005**.
133. UHLEMANN AC, VONTHEIN R, EMMER SA, LELL B e KREMSNER PG. DNA phasing by TA dinucleotide microsatellite length determines in vitro and in vivo expression of the gp91phox subunit of NADPH oxidase and mediates protection against severe malaria. *J Infect Dis*, v. 189, n.12, p. 2227-2234, **2004**.
134. UNO K, KATO K, ATSUMI T, SUZUKI T, YOSHITAKE J, MORITA H, OHARA S, KOTAKE Y, SHIMOSEGAWA T e YOSHIMURA T. Toll-like receptor (TLR) 2 induced

- through TLR4 signaling initiated by *Helicobacter pylori* cooperatively amplifies iNOS induction in gastric epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v. 293, n.5, p. G1004-G1012, **2007**.
135. VAN'T HOF RJ, RALSTON SH. Nitric oxide and bone. *Immunology*, v. 103, n.3, p. 255-261, **2001**.
136. VAZQUEZ-TORRES A, JONES-CARSON J, MASTROENI P, ISCHIROPOULOS H e FANG FC. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *J Exp Med*, v. 192, n.2, p. 227-236, **2000**.
137. VEIHELMANN A, HOFBAUER A, KROMBACH F, DORGER M, MAIER M, REFIOR HJ e MESSMER K. Differential function of nitric oxide in murine antigen-induced arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, v. 41, n.5, p. 509-517, **2002**.
138. VERNAL R, DEZEREGA A, DUTZAN N, CHAPARRO A, SILVA A e GAMONAL J. RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. *Oral diseases*, v. 12, n.3, p. 283-289, **2006a**.
139. VERNAL R, PUENTE J, DEL VALLE I, SILVA A e GAMONAL J. High expression levels of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand associated with human chronic periodontitis are mainly secreted by CD4+ T lymphocytes. *J Periodontol*, v. 77, n.10, p. 1772-1780, **2006b**.
140. WADA T, NAKASHIMA T, HIROSHI N e PENNINGER JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*, v. 12, n.1, p. 17-25, **2006**.
141. WANG CY, STASHENKO P. The role of interleukin-1 alpha in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. *Oral Microbiol Immunol*, v. 8, n.1, p. 50-56, **1993**.
142. WANG JC, HEMAVATHY K, CHARLES W, ZHANG H, DUA PK, NOVETSKY AD, CHANG T, WONG C e JABARA M. Osteosclerosis in idiopathic myelofibrosis is related to the overproduction of osteoprotegerin (OPG). *Exp Hematol.*, v. 32, n.10, p. 905-910, **2004**.
143. WEI XQ, CHARLES IG, SMITH A, URE J, FENG GJ, HUANG FP, XU D, MULLER W, MONCADA S e LIEW FY. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*, v. 375, n.6530, p. 408-411, **1995**.

144. WIMALAWANSA SJ, DE MARCO G, GANGULA P e YALLAMPALLI C. Nitric oxide donor alleviates ovariectomy-induced bone loss. *Bone*, v. 18, n.4, p. 301-304, **1996**.
145. WINTERBOURN CC, SUTTON HC. Iron and xanthine oxidase catalyze formation of an oxidant species distinguishable from OH.: comparison with the Haber-Weiss reaction. *Arch Biochem Biophys*, v. 244, n.1, p. 27-34, **1986**.
146. WONG BR, BESSER D, KIM N, ARRON JR, VOLOGODSKAIA M, HANAFUSA H e CHOI Y. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell*, v. 4, n.6, p. 1041-1049, **1999**.
147. YANG LC, HUANG FM, LIN CS, LIU CM, LAI CC e CHANG YC. Induction of interleukin-8 gene expression by black-pigmented *Bacteroides* in human pulp fibroblasts and osteoblasts. *Int Endod J*, v. 36, n.11, p. 774-779, **2003**.
148. YANG S, RIES WL e KEY LL. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in the formation of superoxide in osteoclasts. *Calcif Tissue Int*, v. 63, n.4, p. 346-350, **1998**.
149. ZHENG H, YU X, COLLIN-OSDOBY P e OSDOBY P. RANKL stimulates inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production in developing osteoclasts. An autocrine negative feedback mechanism triggered by RANKL-induced interferon-beta via NF-kappaB that restrains osteoclastogenesis and bone resorption. *J Biol Chem*, v. 281, n.23, p.15809-15820, **2006**.

Anexos

Anexo 1

International Endodontic Journal

doi:10.1111/j.1365-2591.2009.01595.x

An *in vivo* experimental model to assess furcal lesions as a result of perforationM. J. B. Silva¹, M. V. Caliri³, A. P. R. Sobrinho², L. Q. Vieira¹ & R. M. E. Arantes³

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; ²Departamento de Odontologia Restaurativa, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; and ³Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Abstract

Silva MJB, Caliri MV, Sobrinho APR, Vieira LQ, Arantes RME. An *in vivo* experimental model to assess furcal lesions as a result of perforation. *International Endodontic Journal*, 42, 922-929, 2009.

Aim To design and validate a rat molar model of furcal perforation to allow investigation of the biological phenomena that follow and to explore its potential for evaluating repair materials under standardized conditions.

Methodology Eighteen male Wistar rats were used. Surgical aseptic procedures were carried out in order to open the pulp chamber of a first molar tooth. A cavity was prepared on the floor of the pulp chamber using a ¼ round bur that created a communication between the furcation and the periodontal tissues. Six animals for each time point were sacrificed on days 14, 21 and 28 to assay morphological changes at the furcation region of molars. Maxillary bone was processed,

removed and sectioned. Cellular infiltration, collagen deposition and bone resorption were assessed by histological analysis. Cellularity in the lesion area was determined by morphometric analysis. Data were analysed using parametric Student's *t*-test.

Results A furcal perforation model was standardized in which both radiological outcome and periodontal tissue reactions could be assessed through evaluation of cellularity, osteoclast activity and collagen deposition. The morphometric analysis revealed a greater number of cells 21 day post-surgery when compared with 14 days.

Conclusion This animal model was suitable for radiological and histological evaluation of the processes that accompany surgical furcal perforation.

Keywords: animal models, biomaterials, furcal perforations.

Received 3 September 2008; accepted 14 April 2009

Introduction

Accidental root canal or furcal perforation complicates the treatment and compromises the outcome of root canal treatment (Seltzer & Bender 1990, Walton & Torabinejad 2002). The prognosis of treatment of

perforations is dependent on site, size, setting time of the repair material, and the efficacy of the material in terms of to seal (Walton & Torabinejad 2002). All of these factors are related to the ability to prevent or eliminate bacterial infiltration (Daoudi & Saunders 2002).

The chronic inflammatory reaction after accidental furcal perforation has been the object of several studies (Bhaskar & Rappaport 1971, Meister *et al.* 1979, Beavers *et al.* 1986, Seltzer & Bender 1990, Balla *et al.* 1991, Arens & Torabinejad 1996, Wu *et al.* 2005, Vajrabhaya *et al.* 2006, Al-Daafas & Al-Nazhan 2007). This inflammatory reaction provokes alveolar bone damage around the perforation site where bone is progressively substituted by granulation tissue. The

Correspondence: Rosa Maria Esteves Arantes, MD, PhD, Laboratório de Neuro-imunopatologia Experimental, Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil (Tel.: +5531 3409 2896/2884; fax: +5531 3409 2879; e-mail: rosa@icb.ufmg.br).

lack of bone tissue leads to loss of periodontal attachment that can affect tooth stability (Arens & Torabinejad 1996, Wu *et al.* 2005, Vajrabhaya *et al.* 2006, Al-Daafas & Al-Nazhan 2007).

Accidental furcal perforation has stimulated evaluation of the immunological responses that occur in the periodontal tissues and also the materials to seal the defects. It is believed that an ideal sealing material should seal the communication between the periodontium and pulp chamber and, at the same time, be biocompatible so as to induce bone and cement deposition (Hartwell & England 1993, Bernabé & Holland 2004). However, so far no ideal sealing material has been available.

To evaluate the prognosis and the best treatment choice different animal models have been used. Small rodents have many advantages as experimental models: (i) age and genetic rodent background can be well defined; (ii) better cost benefits; (iii) mouse and rats may be kept in controlled environments easily; (iv) there is a wide variety of gene knockout models. The rat bears much resemblance to man with respect to periodontal anatomy, development and composition of dental plaque, histopathology of periodontal lesions, and basic immunobiology (Klauser 1991). In this context, the characterization of alternative rodent models for dental research is important. Therefore, this study aimed at describing a new model to evaluate the outcome of furcal perforation including histopathological aspects using rats as the experimental model.

Material and methods

Animals

Wistar male rats weighing 240–260 g were obtained from CEBIO (Centro de Bioterismo da UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil) and kept in a conventional animal house with barriers and controlled light cycle. The experimental protocol was approved by the institutional animal ethical committee (protocol number 097/04, CETEA – UFMG). Six rats were used for each time point: 14, 21 and 28 days after the surgical procedure. Three rats were used as controls.

Anaesthesia

All experimental procedures were carried out under general anaesthesia. Rats were injected intramuscularly with 100 mg kg⁻¹ of ketamine hydrochloride (Dopalen, Division Vetbrands Animal Health, Jacareí, SP, Brazil) and 10 mg kg⁻¹ of Xilazine (Anasedan,

Agribrands do Brasil Ltda, Paulínia, SP, Brazil). The absence of flick reflex to hindpaw interdigital skin stretch was documented before the beginning of surgical procedures.

Surgical procedures

All experimental procedures were carefully performed under aseptic condition to avoid contamination. The disinfection of the surgical field was accomplished as proposed by Möller (1966).

Access to the pulp chamber in the rat molar tooth was prepared via the occlusal surface using a number 33½ carbide bur (KG Sorensen, Barueri, SP, Brazil) coupled to a controlled rotation handpiece (Driller, São Paulo, SP, Brazil) under air cooling. Once the pulp was exposed, the roof of the chamber was removed with an Endo Z bur (Dentsply Maillefer®, Catanduva, SP, Brazil). Coronal pulp tissue was removed using an endodontic probe until the level of root canal orifices. Haemorrhage was controlled by irrigating the chamber with saline solution and by applying pressure with sterilized cotton balls. As soon as bleeding was controlled, the chamber was irrigated again with saline solution and dried with cotton pellets. Subsequently, a perforation was created in the centre of the pulp chamber floor towards the alveolar bone using a number ¼ carbide drill (KG Sorensen, Barueri, SP, Brazil). To standardize the depth of the perforation, a cursor was glued to the drill 1 mm from its tip; the width was limited to the bur diameter (0.5 mm). A layer of gutta percha was inserted on the pulp chamber floor, avoiding contact between the sealing material and the perforation site. Condensation of gutta-percha was accomplished with the endodontic plugger and the excess was removed and contoured using a Hollemback 3S (SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The tooth was restored with silver amalgam that was burnished using Dycal instrument (SS White); finally, the waste materials was removed using sterilized cotton balls. Prior to sacrifice the integrity of the amalgam was checked under an endodontic microscopy (Alliance microscopy, Sao Paulo, SP, Brazil).

MTA sealing procedure: testing the model application

To evaluate if it would be feasible to seal the experimental perforation and to analyse the surrounding periodontium tissues, six animals had their perforations filled with grey MTA (Ángelus®, Londrina, PR, Brazil). This material was manipulated according to the

manufacturer's recommendation and inserted using a probe. Animals were killed on day 21 post-surgery.

A video animation was designed using the blender software (Blender Foundation, Amsterdam, the Netherlands) to represent the entire surgical procedure (see Video Clip S1 of Supporting Information).

Radiographic procedures

Prior to the sacrifice, the animals were anaesthetized and killed by decapitation on days 14, 21 and 28 after the procedure. The hemi-maxilla was removed and radiographs were taken using a dental X-ray unit (Bioatlant, Ribeirão Preto, SP, Brazil). The optimal exposure parameters were determined as 0.12 s (70 kVp, 10 mA). Ekta-speed plus X-ray film (Eastman Kodak Co, Rochester NY, USA) was placed and fixed on a wooden surface to avoid movement. Then, the buccal side of the maxillary bone was placed so that side faced the machine. To take the image, the X-ray cone was set perpendicular to the X-ray film and 5 cm from it.

Histological preparation

The hemi-maxillas were immersed to 10% buffered formalin for 72 h at room temperature. Demineralization was performed for 30 days in EDTA solution (10% and pH 7.2) (Merck; Darmstadt; Germany). After demineralization, the samples were washed in running tap water for 24 h. Restorations were removed from the access cavities and the tissues were routinely processed for paraffin embedding. The hemi-maxillas were embedded with the buccal side of molars facing the base of the paraffin block. Consecutive (buccal-lingual direction) sections of 5 μ m encompassing the perforation of the furcation area and both mesial and distal roots were stained with Haematoxylin/Eosin (H&E) and Gomori's Trichome and used to assess inflammatory infiltration, periodontal ligament organization and bone resorption.

Morphometric analysis

The inflammatory cells infiltrating the tissue adjacent to the perforation area was quantified. Images taken from the furcal areas were used to assay quantitatively the longitudinal inflammatory cell infiltration that occurred around the perforation, as shown in Fig. 3.

Quantification of the inflammatory cells in the furca area was conducted from three images selected from

the same animal. The images were obtained at 40 \times magnification through a JVC TK-1270-RGB adapted to a microscope and analysed using KS300 software built into a Kontron Elektronik/Carl Zeiss image analyzer (Caliari 1997). An automatic macro recorder assembler (an algorithm of the KS300 software) was elaborated for capture, image processing and segmentation, definition of morphometrical conditions and counts of all the cells detected in each image. Image processing techniques were applied. Segmentation permitted the separation of these nuclei from cytoplasm and other structures in the section, such as blood vessels and extracellular space. Consequently, a binary image was created containing just the nuclei and other spaces (Pacheco *et al.* 2008). The nucleus from the cellular types usually found in the furca area and newly recruited leukocytes were then counted. It was imperative that only connective tissue, excluding bone and root dentine were visualized. This approach limited the acquisition of more than three images. The measurements were made by an observer who was unaware of the nature of the tissue sample. Three nonoperated rats were used as reference of normal periodontal cellularity.

Statistical analysis

Statistical analysis of mean values of cellular numbers obtained by morphometry was carried out using parametric Student's *t*-test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Clinical aspects

After anaesthesia and prior to sacrifice the animals were submitted to clinical evaluation. Animals tolerated the surgical procedure well and did not have signs of distress, weight loss or oral swelling. Colour and texture of the gingival regions were not altered.

Radiographic assessments

Figure 1a represents the nonoperated furcation and its adjacent tissue. Radiographs were performed to allow visualization of bone resorption. Radiographs were effective in revealing the three molar teeth as well as their associated alveolar bone and periodontal ligament space (Fig. 1b). Radiographic analyses demonstrated the position of the perforation (Fig. 1c) and, in some animals, interdental crestal destruction. In perforation

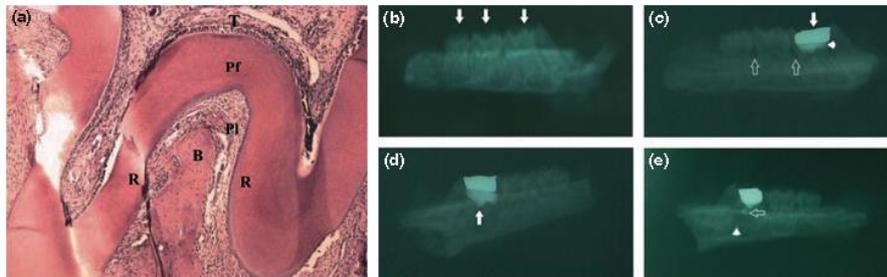


Figure 1 Histological aspect of the first left maxillary molar and radiograph aspects of tooth and periodontium tissue. (a) Panoramic normal histological aspect of the molar. (T, pulp tissue; PF, pulp chamber floor; PL, periodontal ligament; R, root; B, interradicular bone), H&E, $\times 40$. (b) Radiological aspects of nonoperated group. White arrows mark the three molars. (c) Operated molar at day 14 post-surgery. White arrow marks the amalgam restoration. Note the gutta-percha material (arrow head). Open white arrow marks periodontal bone loss. (d) and (e) Operated and MTA-treated molar at day 21 post surgery. The white arrow represents MTA material sealing the furcal perforation. Note the MTA periodontium extrusion (open white arrow) and alveolar bone loss (arrow head).

sites sealed by MTA, radiographs demonstrated that it extended into the periodontal tissues (Fig. 1d,e).

Histopathology

Figure 2 shows the furcation area from operated animals on days 14, 21 and 28 post-surgery. On day 14, the periodontal ligament presented significant alterations in its architecture, showing intense cellular infiltration and edema, especially close to the perforation area (Fig. 2a). The following aspects were observed: mononuclear and polymorphonuclear cells prevailed in the underlying inflammatory infiltrate; edema interposition between tissue elements; intense vascular neoformation (Fig. 2b, inset); cement and root dentine reabsorption (Fig. 2f); intense collagen and connective tissue deposition and osteoclastic activity (Fig. 2f inset). On day 21 post-surgery, the samples showed chronic mononuclear inflammatory infiltrate around the perforation area. Collagen deposition was observed in the surrounding tissue apart from the perforation area (Fig. 2c). Fig. 2e represents samples from animals sacrificed 28 days after surgery. It shows a discrete chronic inflammatory infiltrate (Fig. 2e) and evidence of periodontal reorganization. In one sample, small necrotic areas surrounded by polymorphonuclear cells and debris were observed close to the deep bone layer, indicating that in some cases the surgical procedure resulted in bone microabscesses (data not show).

Figure 2d represents samples from rats that were killed on day 21 after surgery in which perforations were sealed by MTA. It demonstrates the presence of debris inside the perforation sites which could be MTA residue. The adjacent connective tissue presented a prevalence of mononuclear cells in the infiltrate, despite the presence of polymorphonuclear cells in some areas.

Morphometric analysis

As an example of quantitative analysis made possible by this model, we quantified the inflammatory cells infiltrating the tissue adjacent to the perforation area. Images taken from furcal area were used to assay quantitatively the longitudinal inflammatory cell infiltration that occurred around the perforation, as shown in Fig. 3. It was observed that cell numbers were much higher in furcal areas of operated animals than in animals that were not submitted to surgery.

Discussion

It is fundamental to the treatment of a perforation that the site does not become infected, and that it is sealed immediately. Prognosis of treatment depends on the perforation site, size of damage, adjacent periodontal condition and type of sealing material (Walton & Torabinejad 2002). The sealing ability of the material and its possible extrusion into the periodontal area should also be considered. Furthermore, good visibility

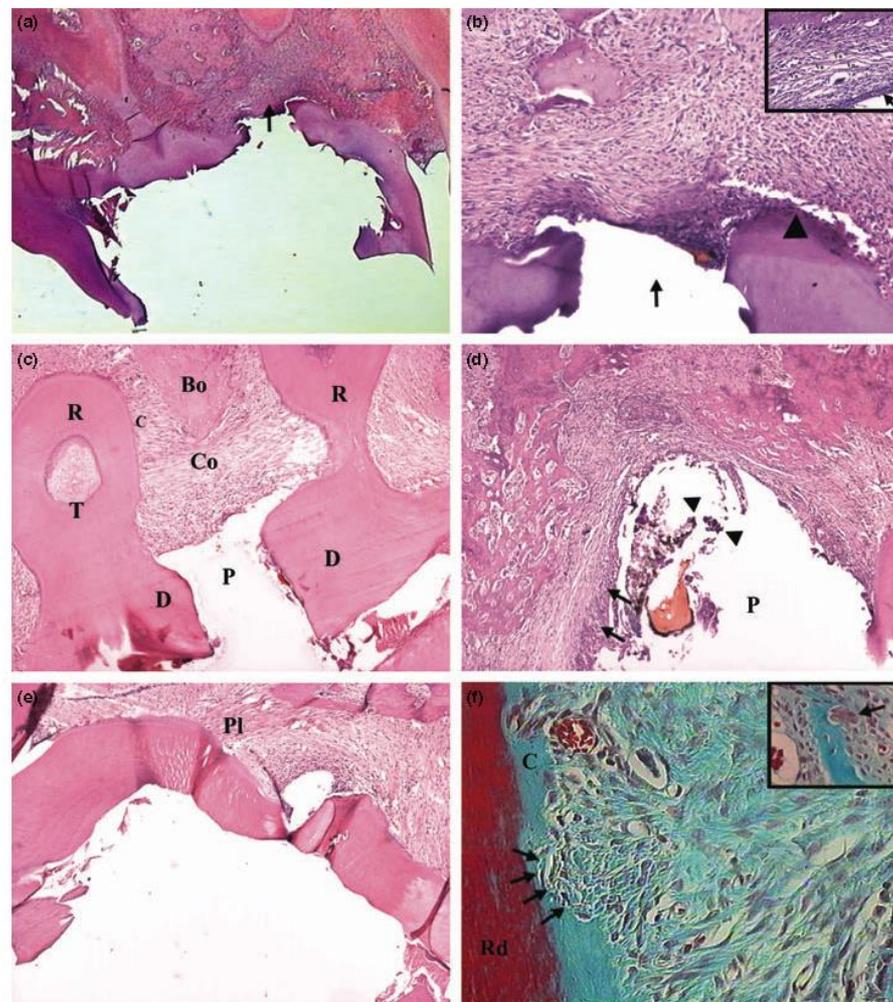


Figure 2 Histological aspects of the rat furcal lesion. (a) Day 14 post-surgery, perforation area showing granulation tissue (arrow). (b) Higher magnification of (a) inflammatory cells at the periphery of the perforation and disorganization of periodontal ligament (inset, arrow), the perforation site (arrow) and MTA fragments (arrow heads). (c) and (e) day 21 and 28, respectively showing the evolution of lesion towards repair. (d) MTA-treated perforation at day 21, residues of MTA are present (arrows heads), notice the granulation tissue at the border of the perforation (arrows). (f) Intense vascular neoformation and deposition of collagen in the periodontal tissue, cement reabsorption (arrows), and osteoclastic activity (inset, arrow). C, cement; Co, collagen deposition T, pulp tissue; R, root; Bo, inter root bone D, dentine; P, perforation; Pl, periodontal ligament. (a), (c), (d) and (e) H&E, $\times 100$; (b), H&E, $\times 200$; (f) Gomori's trichrome, $\times 400$ and insets, $\times 400$.

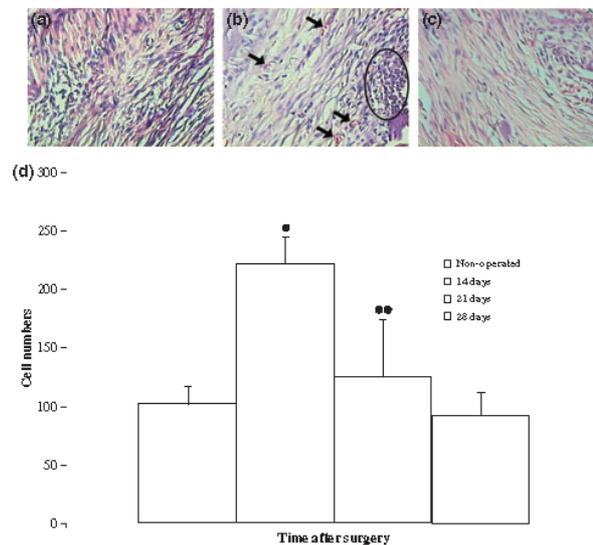


Figure 3 (a), (b) and (c) show, respectively, the intensity of periodontal tissue cellularity on days 14, 21 and 28 post-surgery. Also notice the presence of vascular congestion (small black arrows) and polymorphonuclear cells (encircled) on day 21 (H&E, $\times 400$); (d) Morphometry of furcal lesion periodontal tissue. The graphic shows the average of cell numbers counted in two fields per animal sample at 400x magnification, at each time point. Data are presented as mean values of counted cells in each animal ($n = 3$). • Statistically significant difference ($P < 0.05$) between data from the non-operated group and the operated group 14 days post-surgery. •• Statistically significant difference ($P < 0.05$) between data from the operated groups on days 14 and 21 post-surgery.

of the perforation will help to facilitate the repair procedure (Daoudi & Saunders 2002). Hence, a model that simulates as much as possible the human clinical situation is crucial to the systematic assessment of the many biological aspects involved in this procedural accident.

In this study, all efforts were undertaken to reproduce the clinical conditions in an experimental model. Thus, the design of the stainless steel clamp was modified to increase its ability to completely grasp the tooth (Sampaio 1967). All surgical procedures were performed under aseptic conditions, since a rubber dam could isolate the tooth in a similar fashion to the practice in humans.

It should be recognized that the inflammatory response in rodents is different from that found in humans, however, the rat was selected as a model because the periodontal anatomy, the development of plaque and histopathology of the periodontal lesion in this animal is similar to that found in humans (Klausen

1991, Genco *et al.* 1998). Other advantages include knowledge of animal age, genetic background, and the ethical and economical issues that contraindicate the choice of large animals for research (Beavers *et al.* 1986, Balla *et al.* 1991, Arens & Torabinejad 1996, Bramante *et al.* 2004). In addition, the rat model provides good access to the tooth and allows visibility of the surgical field. As manipulation of genetic and pharmacological parameters is possible in the rat, the establishment of this model will allow further studies on furcal perforation.

Histopathological results demonstrated the effects of the furcal lesion on the periodontal tissues. An increased number of polymorphonuclear cells at 14 day after surgery could be observed, counterbalanced by prevailing mononuclear cells on days 21 and 28. At 28 days, an increase of collagen deposition and an exuberance of granulation tissue were observed. Furthermore, morphometric assessments were in agreement with outcomes observed by previous workers (Balla *et al.* 1991,

Sousa et al. 2004) and showed an increase in inflammatory cell numbers around furcal perforations, which decreased with time. Other histological parameters such as periodontal ligament thickness, bone resorption area, collagen deposition could be accessed easily. Furthermore, despite its limitations this model was useful in accomplishing qualitative and quantitative (by morphometry) assessments.

It is well-known that failure of perforation repairs may be the result of the absence of a seal (Saunders & Saunders 1994). Therefore, in this study, perforations were sealed with MTA and histopathological analysis was performed. This is an example of the application of this model to analyse the biocompatibility aspects of sealing materials. The preliminary results presented here indicate that the presence of MTA may interfere positively with lesion progression. The assessment was taken on day 21 post-surgery, but further and systematic investigations are necessary.

The radiographic technique proposed revealed the anatomical structures of the normal periodontal and also demonstrated the adaptation of the filling materials, the perforation position and, in some cases, the destruction of interdental crest of bone. Alveolar bone mineral density was previously documented in mandibular radiographs and the film used was tested in rats previously (Xiong et al. 2007, Mahl & Fontanella 2008). Although morphometrical evaluation of alveolar bone loss was not documented, correlation between bone resorption and histological parameters has been described previously (Waterman et al. 1998, Teixeira et al. 2000, Xiong et al. 2007).

Conclusion

This experimental animal model for furcal perforation is not totally comparable to human models of furcal lesions. However, under carefully standardized conditions, this model can be used to simulate the inflammatory process induced iatrogenically in humans during root canal treatment as an effective tool to study several aspects of tissue reaction to this specific kind of injury. Therefore, it is suitable for other studies on the triggering and control of the inflammatory reaction, as well as on the search for suitable sealing materials.

Acknowledgements

R.M.E. Arantes and L.Q. Vieira are supported by research fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). This work

was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (CBB APQ-1323-3.13/07 and CNPq (grant number 350567/1995-6 and 571093/2008-6). The authors are indebted to the technicians Vânia Aparecida do Nascimento Silva for histopathological processing.

References

- Al-Daafas A, Al-Nazhan S (2007) Histological evaluation of contaminated furcal perforation in dogs' teeth repaired by MTA with or without internal matrix. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology* **103**, e92-9.
- Arens DE, Torabinejad M (1996) Repair of furcal perforations with mineral trioxide aggregate: two case reports. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology* **82**, 84-8.
- Balla R, LeMonaco CJ, Skribner J, Lin LM (1991) Histological study of furcation perforations treated with tricalcium phosphate, hydroxylapatite, amalgam, and Life. *Journal of Endodontics* **17**, 234-8.
- Beavers RA, Bergenholz G, Cox CF (1986) Periodontal wound healing following intentional root perforations in permanent teeth of Macaca mulatta. *International Endodontic Journal* **19**, 36-44.
- Bernabé PFE, Holland R (2004) Cirurgia paraendodôntica: como praticá-la com embasamento científico. In: Estrela C, *Ciência Endodôntica*, 3rd edn. Sao Paulo, Brazil: Artes Medicas, pp. 657-797.
- Bhaskar SN, Rappaport HM (1971) Histologic evaluation of endodontic procedures in dogs. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* **31**, 526-35.
- Bramante CM, Berbert A, Bernardineli N, Gomes de Moraes I, Garcia RB (2004) *Acidentes e complicações no tratamento endodôntico: soluções clínicas*, 2nd edn. Sao Paulo, Brazil: Santos.
- Calari MV (1997) *Princípios Básicos de Morfometria Digital: KS300 para iniciantes*, Editora UFMG edn. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil: UFMG.
- Daoudi MF, Saunders WP (2002) In vitro evaluation of furcal perforation repair using mineral trioxide aggregate or resin modified glass ionomer cement with and without the use of the operating microscope. *Journal of Endodontics* **28**, 512-5.
- Genco CA, Van DT, Amar S (1998) Animal models for Porphyromonas gingivalis-mediated periodontal disease. *Trends in Microbiology* **6**, 444-9.
- Hartwell GR, England MC (1993) Healing of furcation perforations in primate teeth after repair with decalcified freeze-dried bone: a longitudinal study. *Journal of Endodontics* **19**, 357-61.
- Klausen B (1991) Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *Journal of Periodontology* **62**, 59-73.

- Mahl CR, Fontanella V (2008) Optimal parameters for lateral oblique radiographs of rat mandibles. *Dentomaxillofacial Radiology* **37**, 224–7.
- Meister F, Lommel TJ, Gerstein H, Davies EE (1979) Endodontic perforations which resulted in alveolar bone loss. Report of five cases. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* **47**, 463–70.
- Möller AJR (1966) Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontol Tidskr* **20**, 74–5.
- Pacheco CMF, Queiroz-Junior CM, Maltos KLM et al. (2008) Crucial role of peripheral kappa-opioid receptors in a model of periodontal disease in rats. *Journal of Periodontal Research* **43**, 730–6.
- Sampaio P (1967) Placement of a rubber dam on rat molars. *Journal of Dental Research* **46**, 1102.
- Saunders WP, Saunders EM (1994) Coronal leakage as a cause of failure in root-canal therapy: a review. *Endodontics & Dental Traumatology* **10**, 105–8.
- Seltzer RE, Bender IB (1990) *The Dental Pulp*, 3rd edn. Philadelphia: JB Lippincott.
- Sousa CJ, Loyola AM, Versiani MA, Biffi JC, Oliveira RP, Pascon EA (2004) A comparative histological evaluation of the biocompatibility of materials used in apical surgery. *International Endodontic Journal* **37**, 738–48.
- Teixeira FB, Gomes BP, Ferraz CC, Souza-Filho SC, Zaia AA (2000) Radiographic analysis of the development of periapical lesions in normal rats, sialoadenectomized rats and sialoadenectomized-immunosuppressed rats. *Dental Traumatology* **16**, 154–7.
- Vajrabhaya LO, Korsuwannawong S, Jantarát J, Korre S (2006) Biocompatibility of furcal perforation repair material using cell culture technique: Ketac Molar versus ProRoot MTA. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology* **102**, e48–50.
- Walton RE, Torabinejad M (2002) *Principles and Practice of Endodontics*, 3rd edn. Oxford, UK: W B Saunders Co.
- Waterman PA, Torabinejad M, McMillan PJ, Kettering JD (1998) Development of periradicular lesions in immunosuppressed rats. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology* **85**, 720–5.
- Wu MK, van der Sluis LW, Wesselink PR (2005) The risk of furcal perforation in mandibular molars using Gates-Glidden drills with anticurvature pressure. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology* **99**, 378–82.
- Xiong H, Peng B, Wei L, Zhang X, Wang L (2007) Effect of an estrogen-deficient state and alendronate therapy on bone loss resulting from experimental periapical lesions in rats. *Journal of Endodontics* **33**, 1304–8.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Video Clip S1. A video animation was designed using the blender software (Blender Foundation, Amsterdam, the Netherlands) to represent the entire surgical procedure. The video clip is in avi format.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.