FRANCISCO WANDERLEY GARCIA DE PAULA E SILVA

**INVESTIGAÇÃO DE POTENCIAIS REGULADORES DA INFLAMAÇÃO, OSTEOCLASTOGÊNESE E
REABSORÇÃO ÓSSEA PERIAPICAL**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Livre-Docente junto ao
Departamento de Clínica Infantil.

Ribeirão Preto

2016

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Francisco Wanderley Garcia de Paula e

Investigação de potenciais reguladores da inflamação, osteoclastogênese e reabsorção óssea periapical. Ribeirão Preto, 2016.

118 p. : il.; 30 cm.

Tese de Livre-Docência apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Lesão periapical	2. Inflamação	3. Osteoclastogênese
4. Reabsorção óssea	5. Mediadores Lipídicos	6. Mediadores Inflamatórios
7. Enzima 5-lipoxigenase	8. Leucotrieno B ₄	

FOLHA DE APROVAÇÃO

Silva FWGP. **Investigação de potenciais reguladores da inflamação, osteoclastogênese e reabsorção óssea periapical.** Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Livre-Docente junto ao Departamento de Clínica Infantil.

Data da defesa: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

FRANCISCO WANDERLEY GARCIA DE PAULA E SILVA

- Nascimento** 28 de março de 1982, Itamogi, MG
- Filiação** Francisco Wanderley de Paula e Silva
Maria Angélica Garcia de Paula e Silva
- 2000-2003** Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
Iniciação científica: Avaliação do perfil de sensibilidade de *Streptococcus mutans*, isolados de crianças e adolescentes asmáticos, frente a anti-sépticos orais.
Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Monteiro de Souza-Gugelmin
- 2004-2006** Aperfeiçoamento no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
- 2004-2006** Mestrado em Odontopediatria
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
Dissertação: Resposta pulpar e periapical em dentes de cães após pulpotomia e utilização da proteína óssea morfogenética (rhBMP-7). Estudo histopatológico e radiográfico.
Orientadora: Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva
- 2006-2009** Doutorado em Ciências
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
Tese: Métodos de avaliação e mecanismos envolvidos no reparo apical e periapical pós-tratamento endodôntico em dentes com lesão induzida experimentalmente.
Orientadora: Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva
Co-orientadora: Profa. Dra. Yvonne Lorraine Kapila
- 2007-2008** Programa de Doutorado com Estágio no Exterior
Mesenchymal Biology and Signaling Laboratory
University of Michigan, School of Dentistry, Ann Arbor, MI, EUA
Bolsa: CAPES / PDEE (0668/07-9)
- 2011-2014** Pós-Doutorado em Imunologia
Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
Supervisora: Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli

Trabalho realizado no ***Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses*** do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e nos ***Laboratórios de Biologia Molecular e Histologia*** do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, ambas da Universidade de São Paulo.

Apoio financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP** – por meio de Auxílio à Pesquisa Jovem Pesquisador (processo 2010/17611-4).

DEDICO ESTE TRABALHO

À minha família.

Agradeço aos meus pais **Francisco Wanderley de Paula e Silva** e **Maria Angélica Garcia de Paula e Silva** e à minha irmã **Livia Cristina Arcipreti de Paula e Silva**, por tudo.

Obrigado pelo apoio constante, pelos incentivos e pelos esforços. Espero um dia retribuir o cuidado que vocês sempre tiveram comigo.

Agradeço à minha esposa **Maya Fernanda Manfrin Arnez** pelo carinho, companheirismo e compreensão, base do nosso relacionamento. À minha filha **Alice Arnez de Paula e Silva**, por ser tão especial! Tão doce... Minha motivação para seguir em frente. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Às **Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**, **Profa. Dra. Yvonne Lorraine Kapila** e **Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli**. Três professoras muito especiais que acreditaram em algum momento que eu seria capaz de fazer pesquisa. Cada uma com sua particularidade, mas sempre transmitindo ensinamentos que serão eternos. Muito obrigado!

Aos meus alunos **Fernanda Regina Ribeiro Santos Athayde**, **Igor Bassi Ferreira Petean**, **Daniele Lucca Longo**, **Francine Lorencetti da Silva**, **Mariana Daltoé**, **João Pedro de Queiroz Thomé** e **Laura Alves Bastos**, pela grande colaboração na execução deste trabalho. Em cada trecho, eu consigo identificar a participação de cada um de vocês. Obrigado por fazerem nosso time caminhar pra frente.

MEUS AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, na pessoa do atual Reitor **Marco Antonio Zago**. À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da atual Diretora **Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**. Ao Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual Chefe do Departamento **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**.

Aos Professores do Departamento de Clínica Infantil e do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Profa. Dra. Sada Assed (in memorian)**, **Profa. Dra. Aldevina Campos de Freitas**, **Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**, **Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto**, **Profa. Dra. Mírian Aiko Nakane Matsumoto**, **Profa. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuaní**, **Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz**, **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**, **Profa. Dra. Kranya Victória Díaz Serrano**, **Profa. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva**, **Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato**, **Profa. Dra. Andiara De Rossi Daldegan**, **Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano**, **Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho** e **Profa. Dra. Erika Calvano Kuchler**, pela convivência e valiosos ensinamentos na nossa rotina diária.

Aos colegas servidores técnico-administrativos do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Marco Antônio dos Santos**, **Fátima Jacinto Daniel**, **Nilza Letícia Magalhães**, **Filomena Lelli Placciti**, **Micheli Cristina Leite Rovanholo**, **Carolina Paes Torres Mantovani**, **Marília Pacífico Lucisano Politi**, **Fátima Rizóli**, **Carmo Eurípedes Terra Barreto** e **Matheus Morelli Zanela**, pela amizade e atenção que sempre manifestaram.

Aos colaboradores **Profa. Dra. Fabiani Gai Frantz**, **Dr. Carlos Artério Sorgi**, **Dra. Karina Furlani Zoccal** e **Dra. Priscilla Aparecida Tartari Pereira**, pela cordialidade, pelos ensinamentos, pelos questionamentos e pela cooperação durante a realização deste e de outros trabalhos. Aos colegas do **LIIP – Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses** e **LIME – Laboratório de Imunologia e Epigenética**, pelas conversas, pela convivência agradável. Foi um privilégio compartilhar meu tempo com vocês!

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** pelo suporte científico e financeiro fundamentais para a realização deste trabalho.

RESUMO

Silva FWGP. **Investigação de potenciais reguladores da inflamação, osteoclastogênese e reabsorção óssea periapical** [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2016.

A lesão periapical é uma resposta inflamatória que resulta na reabsorção do tecido ósseo ao redor dos dentes. Essa reação é controlada por mediadores inflamatórios e osteoclastogênicos, que atuam no recrutamento de células de defesa, proliferação de células precursoras de osteoclastos, diferenciação e maturação celular, resultando na degradação das matrizes do tecido ósseo. Assim, a identificação de moléculas que participam deste processo se torna oportuna com o objetivo de determinar possíveis alvos-terapêuticos. Portanto, a proposta deste trabalho foi investigar potenciais reguladores da inflamação, osteoclastogênese e reabsorção óssea periapical após indução de lesão periapical experimental em camundongos (*Mus musculus*). Suscintamente, demonstramos que a contaminação dos canais radiculares de dentes molares de camundongos C57Bl6 por micro-organismos advindos da cavidade bucal ou pelo lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) de *E. coli* (0,1 µg / µL) induziram o desenvolvimento da lesão periapical experimental com características distintas. Porém, ambas foram caracterizadas por um aumento local na síntese de RNAm para as enzimas 5-lipoxigenase (5-LO) e ciclo-oxigenase-2 do metabolismo do ácido araquidônico bem como de receptores de superfície (EP1-EP4 e BLT1-BLT2) e nucleares (PPAR) que medeiam os efeitos biológicos dos mediadores lipídicos prostaglandina E₂ e leucotrieno B₄ (LTB₄). Tendo em vista que a contaminação microbiana dos canais radiculares induziu a inflamação periapical e a reabsorção óssea diferentemente do LPS, que induziu somente a inflamação periapical nas condições aqui apresentadas, aprofundamos nossa investigação para identificar outros mediadores inflamatórios envolvidos no processo. Interessantemente, a contaminação dos canais radiculares induziu a síntese de RNAm para citocinas, quimiocinas e seus receptores e, na ausência da via 5-LO, conseguida por meio da utilização de animais *knockout* para o gene *Alox5* (129-Alox5^{tm1Fun}), a produção gênica de diversos mediadores foi inibida. Diferentemente, os reguladores da osteoclastogênese (RANK, RANKL e OPG) e a ativação de osteoclastos *in vivo* foram maiores nos animais deficientes de 5-LO, ainda que esse possível papel protetor não tenha impedido a reabsorção óssea periapical que foi semelhante à observada nos animais selvagens (129). Quando investigado *in vitro*, utilizando uma cultura de células da linhagem monocítica (J774A.1), o leucotrieno B₄, um dos produtos do metabolismo do ácido araquidônico pela via 5-LO, inibiu a transcrição de genes condizentes com um fenótipo osteoclástico e ativação das células, mensurada por meio da atividade da enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato. Em conjunto, estes resultados mostram que a via 5-LO e o mediador lipídico LTB₄ apresentam um papel importante na regulação da síntese de mediadores inflamatórios na lesão periapical e um papel protetor na sinalização osteoclastogênica, prevenindo a formação e ativação de osteoclastos. Não obstante, essa paradoxal relação inflamação-sinalização osteoclastogênica, não impediu a reabsorção óssea durante o desenvolvimento da lesão periapical.

Palavras-chave: Lesão periapical, Inflamação, Osteoclastogênese, Reabsorção óssea, Mediadores lipídicos, Mediadores inflamatórios, Enzima 5-lipoxigenase, Leucotrieno B₄.

ABSTRACT

Silva FWGP. **Investigation of potential regulators of inflammation, osteoclastogenesis and periapical bone resorption** [thesis]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2016.

Apical periodontitis is an inflammatory response that results in resorption of bone tissue surrounding the teeth. This reaction is orchestrated by inflammatory and osteoclastogenic mediators, involved in the recruitment of defense cells, proliferation of osteoclast precursor cells followed by cellular differentiation and maturation, that finally results in degradation of the bone tissue matrix. The identification of molecules that regulate this process becomes appropriate in order to shed light on novel potential therapeutical targets. Therefore, the purpose of this research was to investigate potential regulators of inflammation, osteoclastogenesis and periapical bone resorption after induction of experimental apical periodontitis in mice (*Mus musculus*). Briefly, we demonstrated that contamination of molar root canals of C56Bl6 mice by microorganisms from the oral cavity or inoculation of bacterial lipopolysaccharide (LPS) of *E. coli* (0.1 µg / µL) into the root canals induced the development of apical periodontitis with distinct characteristics, even though both were characterized by a local increase in mRNA synthesis to enzymes of arachidonic acid metabolism 5-lipoxygenase (5-LO) and cyclooxygenase-2 as well as surface (EP1-EP4 and BLT1-BLT2) and nuclear (PPAR) receptors that mediate the biological effects of the lipid mediators prostaglandin E₂ and leukotriene B₄ (LTB₄). Considering that microbial contamination of the root canals induced periapical inflammation and bone resorption unlike LPS that induced only periapical inflammation under the conditions presented here, we carried out the investigation to identify a wide variety of inflammatory mediators involved in the process. Interestingly, contamination of the root canals induced the synthesis of mRNAs for cytokines, chemokines and their receptors and, in the absence of the 5-LO pathway, by means of using *Alox5* knockout mice (129-Alox5^{tm1Fun}), gene expression of several mediators was inhibited. In contrast, the regulators of osteoclastogenesis (RANK, RANKL and OPG) and the *in vivo* activation of osteoclasts were higher in animals deficient for 5-LO, although this protective role did not prevent periapical bone resorption, which was similar to that found in wild type mice (129). *In vitro* investigation, by means of culturing monocytic lineage cells (J774A.1), LTB₄, one of the products of arachidonic acid metabolism by 5-LO, inhibited the transcription of genes that are consistent with an osteoclastic phenotype and cell activation, measured by means of the activity of the enzyme tartrate resistant acid phosphatase. Taken together, these results show that the 5-LO pathway and the lipid mediator LTB₄ have an important role in regulating the synthesis of inflammatory mediators in apical periodontitis and present a protective role in osteoclastogenic signaling, preventing the formation and activation of osteoclasts. Nevertheless, this paradoxical inflammatory-osteoclastogenic signaling did not prevent the periapical bone resorption during development of apical periodontitis.

Key-words: Apical periodontitis, Inflammation, Osteoclastogenesis, Bone resorption, Lipid mediators, Inflammatory mediators, 5-lipoxygenase, Leukotriene B₄.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	11
CAPÍTULO 1.....	15
Contaminação dos Canais Radiculares por Micro-organismos Advindos da Cavidade Bucal e Lipopolissacarídeo Bacteriano como Indutores da Lesão Periapical Experimental e seu Efeito na Síntese de Enzimas e Receptores Envolvidos no Metabolismo do Ácido Araquidônico	
CAPÍTULO 2.....	43
Regulação de Mediadores Inflamatórios, Sinalização Osteoclastogênica e Papel da Via 5-Lipoxigenase na Lesão Periapical Induzida pela Contaminação dos Canais Radiculares	
CAPÍTULO 3.....	75
Papel do Leucotrieno B ₄ , um dos Produtos da Via 5-lipoxigenase, na Diferenciação e Ativação de Osteoclastos a Partir de Células Precursoras	
CONCLUSÕES.....	95
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
REFERÊNCIAS.....	99
APÊNDICE.....	117
ANEXOS	

INTRODUÇÃO

A polpa dental é um tecido conjuntivo frouxo localizado no interior dos canais radiculares do elemento dental. Esse tecido apresenta capacidade de defesa frente aos estímulos pró-inflamatórios, caracterizada pela deposição de um tecido mineralizado com o objetivo de isolar o agente agressor (Lee *et al.*, 2006; Paula-Silva *et al.*, 2009a; Daltoé *et al.*, 2016). Quando essa defesa é vencida, a polpa dental se torna contaminada por micro-organismos advindos das lesões de cárie, o tecido pulpar é destruído e ocorre o aparecimento da lesão periapical no tecido ósseo alveolar subjacente. A lesão periapical representa uma reposta imuno-inflamatória localizada contra os micro-organismos advindos dos canais radiculares (Takehashi *et al.*, 1965; Nair, 1997; Kawashima e Stashenko, 1999; Martón e Kiss, 2014; Paula-Silva *et al.*, 2016) e é caracterizada pela presença de um infiltrado inflamatório misto, composto por linfócitos T e B, neutrófilos, macrófagos e plasmócitos, dependendo do estágio da doença (Stashenko e Yu, 1989; Wang e Stashenko, 1993; Liapatas *et al.*, 2003; De Rossi *et al.*, 2008; Cotti *et al.*, 2014). A resposta inflamatória não-controlada na região periapical leva a reabsorção dos tecidos ósseo e dentário podendo ocasionar a perda do elemento dental (Martón e Kiss, 2014).

Os neutrófilos estão presentes na fase inicial do desenvolvimento da lesão periapical e sua função na patogênese da doença é conhecida (Yamasaki *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 2002; De-Rossi *et al.*, 2008). Com a progressão tempo-dependente, a reação inflamatória se torna crônica e inicia-se o recrutamento de células inflamatórias mononucleares (Stashenko e Yu, 1989; Paula-Silva *et al.*, 2009, 2010; Martón e Kiss, 2014). A presença de linfócitos T *helper* (Th) e T citotóxico, tanto nas lesões periapicais de humanos e como naquelas experimentalmente induzidas, foi relatada em estudos prévios (Stashenko e Yu, 1989; Walker *et al.*, 2000; Liapatas *et al.*, 2003; Kawahara *et al.*, 2004), assim como a função protetora ou estimuladora desempenhada pelas citocinas produzidas pelos linfócitos Th1 (INF- γ), Th2 (IL-4 e IL-10) e Th17 (IL-17) no desenvolvimento da lesão periapical (Yamasaki *et al.*, 2006; De-Rossi *et al.*, 2008; Marçal *et al.*, 2010; Teixeira-Salum *et al.*, 2010; Brito *et al.*, 2012; Carvalho-Fraga *et al.*, 2013; Araújo-Pires *et al.*, 2014). Ainda, a contaminação dos canais radiculares de ratos leucopênicos levou a menor extensão da reabsorção óssea periapical nestes animais, demonstrando a importância da resposta imune mediada por células no desenvolvimento da lesão (Waterman-Junior *et al.*, 1998). Em conjunto, estes estudos indicam que a composição

do infiltrado inflamatório é importante na patogênese das lesões periapicais e recentemente, grupos de pesquisa tem investigado diversos mecanismos envolvidos no recrutamento e migração celular durante o desenvolvimento da doença.

Durante a resposta inflamatória, mediadores bioquímicos são liberados localmente com o objetivo de estimular a resposta imune celular e humoral. Dentre estes mediadores inflamatórios estão os eicosanóides, os quais são sintetizados a partir da metabolização do ácido araquidônico, produzido pela ação das enzimas fosfolipases nos fosfolípidos presentes na membrana celular. Por meio da ação das enzimas ciclo-oxigenases ou lipoxigenases ocorrerão modificações estruturais na cadeia do ácido araquidônico levando a síntese de prostaglandinas e tromboxanos ou leucotrienos e lipoxinas, respectivamente (Williams e Higgs, 1988; Cotran *et al.*, 2000; Bozza *et al.*, 2007; Khanapure *et al.*, 2007; Harizi *et al.*, 2008; Haeggstoom *et al.*, 2010; Hirata e Narumiya, 2012; Le Bel *et al.*, 2014; Capra *et al.*, 2015).

Uma das vias de metabolismo do ácido araquidônico é a via 5-lipoxigenase (5-LO). Na presença de FLAP, uma proteína nuclear associada à membrana, a enzima 5-LO é ativada e oxida o ácido araquidônico, convertendo-o sucessivamente até resultar na geração de leucotrieno B₄ (LTB₄) (Powell e Rokach, 2015). Este mediador está envolvido na quimiotaxia de neutrófilos, células dendríticas e células T, aumenta a permeabilidade vascular e atua diretamente sobre células apresentadoras de antígenos (Rådmark *et al.*, 2015). O LTB₄ exerce suas funções através dos receptores de superfície BLT1 e BLT2, sendo que este último revela baixa afinidade para LTB₄ (Back *et al.*, 2014).

Por outro lado da via de metabolismo do ácido araquidônico, as prostaglandinas, também conhecidas como prostanoides, são produzidas por uma sequência de eventos que envolvem a ação das enzimas COX-1 e COX-2 (Kawahara *et al.*, 2015). A enzima COX-2, considerada a isoforma induzível da COX, é produzida em resposta a diversos estímulos inflamatórios, como fatores de crescimento e citocinas. Esta enzima converte o ácido araquidônico na isoforma intermediária prostaglandina H₂ (PGH₂), a qual é convertida em prostaglandina E₂ (PGE₂) por meio das enzimas prostaglandina E sintase microssomal 1 e 2 (mPGE-1 e mPGE-2). A PGE₂ atua em 4 diferentes tipos de receptores de membrana (EP1, EP2, EP3 e EP4) acoplados à proteína G (G_{as}, G_i e G_q) e, a depender do tipo de receptor estimulado, diferentes vias celulares são ativadas (Aronoff *et al.*, 2004; Serezani *et al.*, 2007; Legler *et al.*, 2010).

Receptores ativados por proliferador de peroxissomo (PPAR) são uma família de

receptores nucleares também ativados por mediadores lipídicos e desempenham um papel importante como fatores de transcrição em eventos como inflamação, diferenciação celular e metabolismo de lipídios em macrófagos e células dendríticas (Chawla *et al.*, 2001; Zoccal *et al.*, 2015). Os receptores PPAR α , PPAR δ e PPAR γ são ativados por ligantes que modificam sua conformação, recrutam co-ativadores de transcrição e regulam a transcrição gênica após se ligarem a sítios regulatórios específicos (Szatmari e Nagy, 2008).

A presença de mediadores lipídicos como a prostaglandina E2 e os leucotrienos B4 e C4 foi previamente demonstrada em lesões periapicais de humanos (McNicholas *et al.*, 1991; Torabinejad *et al.*, 1992; Cotti e Torabinejad, 1994; Eder *et al.*, 2012) e maior expressão de LTB₄ estava positivamente correlacionada clinicamente à presença de sintomatologia dolorosa e histologicamente à presença de células inflamatórias polimorfonucleares (Torabinejad *et al.*, 1992). A inibição da via 5-LO por meio de um medicamento (MK-886) apresentou um papel dual na sinalização osteoclastogênica em camundongos, inibindo a osteoclastogênese em períodos precoces porém estimulando em períodos tardios (Paula-Silva *et al.*, 2016). Entretanto, pouco se sabe sobre o efeito desta via no curso da inflamação periapical e na reabsorção óssea associada, indicando a necessidade de mais estudos nessa linha.

Localmente, existe uma vasta rede de sinalização parácrina e autócrina que permite uma relação direta entre a inflamação periapical e a remodelação do tecido ósseo subjacente. Do ponto de vista molecular, diversas citocinas e fatores de crescimento produzidos sob estímulo inflamatório são essenciais para diferenciação e maturação dos osteoclastos, tais como a vitamina D3, as interleucinas IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, IL-15, IL-17 e IL-18, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e o fator estimulador de formação de colônia de monócitos (M-CSF) (Kobayashi *et al.*, 2000; Steeve *et al.*, 2004; Bar-Shavit, 2007; Trouvin e Goeb, 2010; Boyce, 2013). Esses fatores atuam via estimulação das células progenitoras de osteoclastos ou participando em um sistema parácrino, no qual estão envolvidos os osteoblastos e células da medula óssea. Citocinas pró-reabsorptivas como TNF- α e IL-1 α , modulam este sistema parácrino composto pelo receptor RANK (receptor ativador do fator nuclear kappa B), o ligante do receptor RANK (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG) (Ducy *et al.*, 2000; Tay *et al.*, 2004; Lerner *et al.*, 2004; Leibbrandt e Penninger, 2008).

Assim a proposta deste trabalho foi investigar potenciais reguladores da inflamação, osteoclastogênese e reabsorção óssea periapical após indução de lesão periapical

experimental. Com esta finalidade realizamos uma série de pesquisas aqui apresentadas que demonstram que a contaminação dos canais radiculares por micro-organismos advindos da cavidade bucal e pelo lipopolissacarídeo bacteriano induz o desenvolvimento da lesão periapical experimental, caracterizada por um aumento na síntese de enzimas e receptores envolvidos no metabolismo do ácido araquidônico (Capítulo 1). Verificamos também que mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas e a sinalização osteoclastogênica são regulados positiva ou negativamente pela via 5-lipoxigenase de metabolismo do ácido araquidônico após a invasão microbiana no interior dos canais radiculares durante o curso de desenvolvimento da lesão periapical (Capítulo 2). Finalmente, demonstramos que o leucotrieno B₄, um dos produtos da via 5-lipoxigenase, atua sobre células da linhagem monocítica inibindo a ativação e a transcrição de genes condizentes com um fenótipo osteoclástico (Capítulo 3).

CAPÍTULO 1

CONTAMINAÇÃO DOS CANAIS RADICULARES POR MICRO-ORGANISMOS ADVINDOS DA CAVIDADE BUCAL E LIPOPOLISSACARÍDEO BACTERIANO COMO INDUTORES DA LESÃO PERIAPICAL EXPERIMENTAL E SEU EFEITO NA SÍNTESE DE ENZIMAS E RECEPTORES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO

A importância dos micro-organismos para a gênese da lesão periapical foi demonstrada em um estudo clássico no qual a exposição pulpar ao ambiente bucal em ratos *germ-free* não levou a formação de lesão, enquanto em animais convencionais houve desenvolvimento da lesão após 15 dias da exposição (Kakehashi *et al.*, 1965). Assim, a presença de bactérias no tecido pulpar mostrou ser capaz de estimular a resposta inflamatória local culminando com a reabsorção do tecido ósseo periapical. A interação do número de micro-organismos no interior dos canais radiculares, o grau de virulência e a capacidade de defesa orgânica do hospedeiro determinam a ocorrência de alterações periapicais específicas, de natureza aguda ou crônica (Ørstavik e Pitt-Ford, 1998; Leonardo, 2008; Martón e Kiss, 2014).

Até a década de 1970, o isolamento de micro-organismos dos canais radiculares demonstrava uma composição predominantemente aeróbia e anaeróbia facultativa (Shovelton, 1964; Seltzer, 1988; Assed *et al.*, 1996). Posteriormente, quando técnicas de cultura estritamente anaeróbias passaram a ser utilizadas (Sundqvist, 1992), observou-se que grande parte dos micro-organismos presentes nas infecções do sistema de canais radiculares de dentes com lesão periapical crônica eram anaeróbios obrigatórios (Kantz e Henry, 1974; Seltzer, 1988; Baumgartner e Falkler-Júnior, 1991; Sundqvist, 1992; Tronstad, 1992; Abou-Rass e Bogen, 1998; Onçag *et al.*, 2003; Socransky *et al.*, 2004; Siqueira *et al.*, 2004; Ruvière *et al.*, 2007; Ito *et al.*, 2011), particularmente os Gram-negativos (Tani-Ishii *et al.*, 1994; Assed *et al.*, 1996). As bactérias Gram-negativas apresentam o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) ou endotoxina como componente da parede celular e contém tanto componentes lipídicos quanto porções polissacarídicas, sendo o lípide A considerado a porção tóxica da molécula (Mc Gee *et al.*, 1992; Rietschel e Brade, 1992; Silva *et al.*, 2004). O LPS é liberado durante a ocorrência de estresse celular, multiplicação ou morte bacteriana, estimulando uma reação imuno-inflamatória tecidual (Dahlen e Bergenholtz, 1980; Rietschel e Brade, 1992; Silva *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2004; Graunaite *et al.*, 2011) e reabsorção óssea (Umezue *et al.*, 1989; Silva

et al., 2002; Nelson-Filho *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008; Santos, 2015). A endotoxina estimula os leucócitos a liberarem citocinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e mediadores lipídicos derivados do metabolismo do ácido araquidônico como a PGE₂ (Stashenko, 1990; Martón e Kiss, 2000; Martinho *et al.*, 2012).

Especificamente com relação aos mediadores lipídicos produzidos a partir do metabolismo do ácido araquidônico, concentrações significativamente mais elevadas de PGE₂ foram encontradas em lesões agudas quando comparados às lesões crônicas, sugerindo um papel para as prostaglandinas na patogênese de lesões periapicais em humanos (McNicholas *et al.*, 1991; Shimauchi *et al.*, 1997; Alptekin *et al.*, 2005). O aumento da síntese de PGE₂ em dentes com lesão periapical está correlacionado com alterações inflamatórias e catabólicas que ocorrem nestes tecidos frente a invasão microbiana ou a presença de produtos e subprodutos tóxicos deste processo (Martinho *et al.*, 2011).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a contaminação ou a inoculação de LPS nos canais radiculares de camundongos induz a expressão do gene *Allox5*, que codifica a enzima 5-LO e do gene *Ptgs2*, que codifica a enzima COX-2, importantes para a metabolização do ácido araquidônico (Santos, 2012; Paula-Silva *et al.*, 2016). Entretanto, uma avaliação mais ampla e comparativa entre os dois métodos de indução da lesão periapical sobre a expressão os receptores de superfície (EP1, EP2, EP3 e EP4 para PGE₂ e BLT1 e BLT para LTB₄) e dos receptores nucleares (PPAR α , PPAR γ e PPAR δ) ainda não foi realizada.

Portanto, o objetivo geral deste estudo foi avaliar, *in vivo*, a cinética de desenvolvimento da lesão periapical experimental, induzida pela contaminação dos canais radiculares por micro-organismos advindos da cavidade bucal ou pela inoculação de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Especificamente, os dois métodos foram comparados quanto à regulação de enzimas e receptores de mediadores lipídicos produzidos pelo metabolismo do ácido araquidônico e quanto ao potencial para induzir a resposta inflamatória periapical.

METODOLOGIA

Animais

Animais roedores têm sido comumente utilizados como modelos experimentais para estudar as patologias periapicais (Wang e Stashenko, 1991; De-Rossi *et al.*, 2008; Fukada *et*

al., 2008; Silva *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2015). Os protocolos utilizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais, do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP) (processos CEUA nº 12.1.60.53.8 e 13.1.266.53.6). Foram utilizados 96 camundongos (*Mus musculus*) C57Bl6, machos, com 6 a 8 semanas de idade, pesando de 20 a 22 gramas, provenientes do Biotério II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Para os procedimentos operatórios os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (150 mg / kg; Ketamina 10%; Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP) e xilazina (7,5 mg / kg; Dopaser, Laboratórios Calier S/A, Barcelona, Espanha) por via intramuscular na coxa traseira. Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, alocados em gaiolas de polipropileno e tampas de aço inoxidável perfurado, de 15 × 20 cm (3 animais por gaiola), forradas com maravalha, em temperatura de 22° C e umidade relativa do ar (55 ± 10%) constantes, em um ciclo de claro-escuro de 12 : 12 horas, durante todo o período experimental, com dieta padrão de laboratório e livre acesso à água autoclavada.

Indução da lesão periapical

Foram induzidas lesões periapicais em camundongos posicionados em uma mesa cirúrgica com dispositivo para retração mandibular, permitindo a imobilização dos animais e manutenção da boca aberta, para acesso aos dentes molares. A abertura coronária foi realizada pela face oclusal nos primeiros molares inferiores e superiores, utilizando uma ponta diamantada esférica tamanho 1011 (KG Sorensen Ind. Com. Ltda., Barueri, SP). A seguir, os canais radiculares foram localizados por meio de uma lima tipo K número 06 (Les Fils d'Auguste Maillefer S/A, Suíça) e a polpa radicular removida. A seguir os animais foram distribuídos em dois grupos, nos quais os canais radiculares foram expostos ao ambiente bucal (**Grupo 1**), como descrito previamente (Paula-Silva *et al.*, 2016) ou inoculados com 10 µL de uma solução de lipopolissacarídeo bacteriano de *Escherichia coli* 0127:B8 (L3129; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, EUA) (**Grupo 2**), resuspenso em solução salina, na concentração de 0,1 µg/µl (Santos, 2012). Neste grupo os canais radiculares foram selados com cimento de ionômero de vidro convencional, manipulado de acordo com as instruções do fabricante (S.S. White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, Brasil). Dentes hígidos, sem exposição pulpar,

foram utilizados como controle (**Grupo 3**). Os camundongos foram eutanasiados em uma câmara de CO₂, em diferentes períodos experimentais (7, 14, 21 e 28 dias) após contaminação dos canais radiculares ou inoculação de LPS, com a finalidade de acompanhar a cinética de desenvolvimento da lesão periapical (n= 12 dentes por período). Os animais foram acompanhados ao longo do tempo para avaliação do peso corporal e mortalidade. Os grupos foram comparados entre si por meio do teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey ($\alpha= 0,05$).

Processamento histológico

Os molares inferiores foram utilizados para processamento histológico. As mandíbulas foram dissecadas e removidas com uma tesoura cirúrgica. Os blocos contendo dente e osso foram fixados em formol tamponado a 10% por 24 horas, a temperatura ambiente e desmineralizados em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA; Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ) a 10%, pH 7,4, por aproximadamente 21 dias. Após a desmineralização, as peças foram submetidas à técnica histológica de rotina, sendo lavadas em água corrente por 24 horas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os blocos foram seccionados longitudinalmente, em sentido vestibulo-lingual, para obtenção de cortes com espessura de 5 μ m. As lâminas obtidas foram coradas pela hematoxilina e eosina (HE) para avaliação histopatológica e histométrica.

Avaliação histopatológica e histométrica

Os cortes histológicos corados por HE foram avaliados por microscopia de luz convencional e realizada a mensuração das lesões periapicais (Zeiss Axio Imager, Carl Zeiss AG Light Microscopy, Göttingen, Alemanha), de acordo com parâmetros descrito previamente (Paula-Silva *et al.*, 2009; Santos, 2015; Paula-Silva *et al.*, 2016). Para a análise morfométrica do tamanho das lesões periapicais foi utilizada videomicroscopia com o Software Zeiss AxioVision (Carl Zeiss AG Light Microscopy), em conjunto com o microscópio e videocâmara AxioCam MRc5 (Carl Zeiss AG Light Microscopy), no aumento de 10 $\times$. Para cada espécime, a área da lesão periapical foi delineada e medida em μ m², nas lâminas que representavam o maior diâmetro da lesão. A delimitação da lesão excluiu as estruturas intactas (ligamento

periodontal, cimento e osso alveolar), e incluiu áreas de reabsorção e infiltrado inflamatório. Os grupos foram comparados entre si por meio do teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Sidak ($\alpha=0,05$).

A avaliação histopatológica foi realizada subjetivamente, por um examinador calibrado, sem conhecimento prévio a que grupo pertencia cada espécime. Os dados foram apresentados na forma descritiva.

Análise histomicrobiológica

Os cortes foram corados pelo método de Brown & Brenn modificado para evidênciação de micro-organismos (Engbaek *et al.*, 1979). Inicialmente foram desparafinizados, hidratados e imersos em solução de cristal violeta (Ecibra, Cetus Ind. Com. Prod. Quim. Ltda., São Paulo, SP) tamponada com bicarbonato de sódio (Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ) a 5% por 30 segundos. A seguir, as lâminas foram imersas em solução de iodo por 1 minuto, lavadas em água destilada e imersas em solução de éter-acetona (1 : 1). As lâminas foram lavadas em água destilada e imersas em fucsina básica a 0,25 mg / mL (1 minuto) e posteriormente em ácido pícrico aquoso (2:4:4 Trinitrophenol, $C_6H_2(OH)(NO_2)_3$ - May & Baker Ltda., Inglaterra), por 1 minuto. A seguir foram imersas em acetona p.a. (CH_3COCH_3 , Ecibra) por 15 segundos seguida por imersão rápida em acetona-xilol (1 : 1) e montadas em Permunt® (Fisher Scientific, Fair Lawn, EUA).

Os microrganismos foram observados em microscopia de luz convencional, com imersão à óleo, efetuando-se a diferenciação entre Gram-negativos e Gram-positivos, nos 2 mm apicais, na luz do canal radicular, nas ramificações do delta apical e nas lacunas do cimento. Com esta coloração, as bactérias gram-positivas são coradas em azul e as bactérias gram-negativas em vermelho. Para cada raiz foram analisados, em média, 8 cortes. As lâminas foram avaliadas quanto ao grau de penetração das bactérias de acordo com os escores: (0) ausência de bactérias, (1) presença de bactérias na luz do canal radicular, (2) presença de bactérias nos túbulos dentinários, (3) presença de bactérias no forame apical, (4) presença de bactérias nas lacunas de reabsorção do cimento e (5) presença de bactérias na lesão periapical. Os dados foram apresentados descritivamente como porcentagem de espécimes contendo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas nas diferentes regiões.

Avaliação da expressão gênica de enzimas e receptores do metabolismo do ácido araquidônico por meio de reação da polimerase em cadeia em tempo real (qRT-PCR)***Extração do RNA***

Para extração do ácido ribonucleico (RNA) total foi utilizado um *pool* contendo 3 dentes molares superiores, com peso total médio de 30 mg, por meio do RNeasy Mini kit, um protocolo de extração à base de tiocianato de guanidina (RNeasy® Mini, Qiagen Inc., Valencia, EUA). Os blocos contendo dente e osso foram macerados com auxílio de pinça hemostática e triturados com um homogeneizador de tecidos, em tubos de 2,0 mL esterilizados e livres de RNase (Axygen Inc., NY, EUA), contendo 594 µL de solução tampão de lise RLT e 6 µL de beta-mercaptoetanol (βME). A seguir os tubos foram centrifugados em microcentrífuga (Microcentrífuga modelo 5417R; Eppendorf AG, Hamburg, Germany), a 10.000 rpm, por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 1 volume de etanol a 70%, preparado com água livre de RNase, com a finalidade de fornecer condição apropriada para ligação do RNA à membrana contida na coluna purificação. A seguir 600 µL da solução foram transferidos para uma coluna contendo um tubo coletor acoplado e os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 15 segundos. O filtrado foi descartado e os 600 µL restantes da solução foram transferidos para a coluna e centrifugados novamente. O filtrado foi descartado, 350 µL da solução tampão RW1 foram adicionados à coluna e os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 15 segundos. A seguir 10 µL de DNase I foram diluídos em 70 µL de solução tampão RDD (RNase-Free DNase Set; Qiagen Inc.), o volume total foi adicionado à membrana presente na coluna e as colunas foram incubadas a 25° C, por 15 minutos, para eliminar a possível contaminação com DNA genômico. A seguir 350 µL da solução tampão RW1 foram adicionados à coluna e os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 15 segundos. Posteriormente 500 µL de solução tampão RPE contendo etanol foram adicionados à coluna e os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 15 segundos. Novamente 500 µL de solução tampão RPE contendo etanol foram adicionados à coluna e os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 2 minutos. Com a finalidade de eliminar a possibilidade de carregar remanescentes de solução tampão RPE contendo etanol para as etapas seguintes, o tubo coletor foi descartado, um novo tubo coletor foi inserido na coluna e os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm, por 1 minuto. O tubo coletor foi descartado, um tubo de 1,5 mL foi acoplado à coluna e o RNA presente na membrana foi eluído em 35 µL de água livre de RNase.

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

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

O cDNA foi sintetizado por meio de uma reação de transcrição reversa, a partir de 1 µg de RNA total, utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e o equipamento Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems). Em um tubo de 0,1 mL (Axygen Inc.), o RNA foi incubado com 2,0 µL de solução tampão 10×, 0,8 µL de dNTP mixture 25× (100mM), 2,0 µL de *random primers* 10×, 1,0 µL da enzima *Multiscribe™ Reverse Transcriptase* (50 U/ µL), 1,0 µL de inibidor de RNase e acrescido de água livre de RNase para um volume final de 20 µL. As amostras foram incubadas a 25° C por 10 minutos para ligação do *primer* ao RNA, seguido por incubação a 37° C por 2 horas para transcrição reversa e posterior incubação a 85° C por 5 segundos para inativação da enzima transcriptase. O cDNA resultante foi armazenado a -20° C até o momento do uso.

Para as reações de qRT-PCR, alíquotas de 2 µL (50 ng) de cDNA foram adicionadas a 10,0 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2×, 1,0 µL de TaqMan Gene Expression Assay 20× (par de *primers* + sonda) e acrescido de água livre de RNase para um volume final de 20 µL / poço. *Primers* e sondas para *Ptgs2* (Mm00478374), *Ptger1* (Mm00443098), *Ptger2* (Mm00436051), *Ptger3* (Mm01316856), *Ptger4* (Mm00436053), *Alox5* (Mm01182747), *Alox5ap* (Mm00802100), *Ltb4r1* (Mm02619879), *Ltb4r2* (Mm01321172), *Ppara* (Mm00440939), *Ppard* (Mm00803184) e *Pparg* (Mm01184322), foram obtidos comercialmente e são propriedades privadas, portanto as sequências não estão disponíveis (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems). O gene para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*; Mm99999915) foi utilizado como referência. Para o sistema TaqMan®, foram utilizados *primers* na concentração final de 900 nM cada e sonda MGB (*Minor Groove Binding*) na concentração final de 250 nM. Neste sistema, o fluoróforo 6-FAM foi utilizado como repórter, o qual foi liberado após clivagem pela polimerase com atividade

exonuclease 5'. Para as reações de qRT-PCR foram realizados dois experimentos independentes, em duplicata, utilizando o equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems) e o *Software* Step One versão 2.2.3 (Applied Biosystems).

A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: ativação da polimerase AmpliTaq Gold Enzyme a 95 °C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 1 segundo para desnaturação do DNA e 60°C por 20 segundos para anelamento do *primer* e polimerização. Os resultados foram analisados com base no valor do ciclo limiar (*Ct*, *cycle threshold*), sendo este o ponto correspondente ao número do ciclo no qual a amplificação das amostras atinge um limiar. Este limiar foi determinado entre o grau de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras que permitiu a análise quantitativa da expressão do gene avaliado. Como controle negativo foi utilizada água destilada deionizada, submetida à reação com cada par das sequências dos *primers* e sondas utilizados.

Para normalizar os valores de *Ct*, de forma a considerar diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, o *Ct* determinado para uma amostra foi subtraído do *Ct* do gene de referência (*Gapdh*) da mesma amostra, gerando assim o ΔCt . Para cada gene, o cálculo de expressão relativa foi realizado a partir da diferença entre o ΔCt das amostras e o ΔCt apresentado pelo controle ($\Delta\Delta Ct$), com base na equação: *Expressão relativa* = $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os grupos foram comparados entre si por meio do teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

RESULTADOS

A indução da lesão periapical por meio da contaminação bucal ou pela inoculação de LPS nos canais radiculares não alterou o peso dos animais em nenhum período experimental e foi semelhante ao de animais não submetidos à manipulação ($p > 0,05$). Entretanto, foi observado um ganho de peso ao longo do tempo, sem diferença entre os grupos ($p > 0,05$; Figura 1.1A). O desenvolvimento da lesão periapical também não influenciou a sobrevivência dos animais em função do tempo ($p > 0,05$; Figura 1.1B).

Figura 1.1. Representação gráfica do peso (A) e sobrevivência (B) em função do tempo, após contaminação dos canais radiculares de molares de camundongos ou após inoculação de uma solução de LPS. Camundongos C57Bl6 hígidos foram utilizados como controle.

A contaminação e a inoculação de LPS nos canais radiculares induziram o desenvolvimento da lesão periapical

A contaminação dos canais radiculares após a abertura coronária ao ambiente bucal levou ao desenvolvimento da lesão periapical caracterizada inicialmente, no período de 7 dias, pelo espessamento do ligamento periodontal apical, recrutamento de neutrófilos e macrófagos aos 14 dias, presença de reabsorção óssea aos 21 dias e culminando, aos 28 dias, em intensa infiltração de células inflamatórias, perda de continuidade dos tecidos, edema e extensa reabsorção óssea periapical (Figuras 1.2 e 1.3). Um padrão diferente de desenvolvimento da lesão foi observado quando os canais radiculares foram inoculados com LPS, na concentração de 0,1 µg / µL, aos 7 e 14 dias (Figuras 1.4 e 1.5). Após 21 e 28 dias foi detectado apenas um início de reabsorção óssea extensa com um infiltrado inflamatório leve a moderado. Dentes hígidos foram utilizados como controle nos quais pode se observar um ligamento periodontal íntegro, com presença de fibras inseridas no cimento e no osso alveolar (Figuras 1.2, 1.3, 1.4 e 1.5).

Figura 1.2. Fotomicrografias representativas da região periapical de molares de camundongos C57Bl/6 hígidos (A) e após contaminação dos canais radiculares por micro-organismos da cavidade bucal, aos 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 28 (E) dias da exposição. HE, aumento original 5×.

Figura 1.3. Fotomicrografias representativas da região periapical de molares de camundongos C57Bl/6 hígidos (A) e após contaminação dos canais radiculares por micro-organismos da cavidade bucal, aos 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 28 (E, F) dias da exposição. HE, aumento original 40x.

Figura 1.4. Fotomicrografias representativas da região periapical de molares de camundongos C57Bl/6 hígidos (A) e após contaminação inoculação de LPS (0,1 µg / µL) nos canais radiculares, aos 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 28 (E) dias. HE, aumento original 10×.

Figura 1.5. Fotomicrografias representativas da região periapical de molares de camundongos C57Bl6 hígidos (A) e após inoculação de LPS (0,1 µg / µL) nos canais radiculares, aos 7 (B), 14 (C), 21 (D) e 28 (E) dias. HE, aumento original 20×.

A histometria das lesões periapicais revelou um aumento do espaço periapical devido à reabsorção óssea nos dentes submetidos à contaminação bucal aos 21 e 28 dias após a exposição, diferentemente dos dentes submetidos à inoculação de LPS nos canais radiculares ou dentes hígidos com ligamento periodontal e osso alveolar íntegros ($p < 0,05$; Figura 1.6).

Figura 1.6. Histometria da lesão periapical experimental, por meio da mensuração da área da lesão ou do ligamento periodontal apical em μm^2 , avaliada aos 7, 14, 21 e 28 dias após contaminação dos canais radiculares de molares de camundongos C57Bl6 ou após inoculação de uma solução de LPS. * $p < 0,05$ comparado à medida do ligamento periodontal de dentes hígidos (linha tracejada); # $p < 0,05$ comparado ao grupo LPS.

Estes resultados mostram que a contaminação bucal leva ao desenvolvimento da lesão periapical caracterizada pelo recrutamento de células inflamatórias, destruição tecidual e reabsorção óssea enquanto o LPS, na concentração utilizada, induz o recrutamento celular sem perda óssea apical.

A disseminação apical das bactérias ocorreu concomitantemente à progressão da reabsorção óssea periapical

Com o objetivo de investigar a distribuição das bactérias após exposição dos canais radiculares ao ambiente bucal, as lâminas foram coradas pelo Método de Brown e Brenn modificado. Inicialmente, aos 7 dias, a microbiota que colonizou os canais radiculares era composta por micro-organismos Gram-positivos e localizada no canal principal, em todos os

espécimes avaliados. Aos 14 dias, as bactérias Gram-positivas foram encontradas no canal principal e também nos túbulos dentinários e iniciou-se a colonização Gram-negativa no canal principal, em cerca de 30% dos espécimes. Aos 21 dias, quando foi observada inflamação e reabsorção óssea periapical, foram encontradas bactérias Gram-positivas no disseminadas pelo canal principal, túbulos dentinários, forame apical e no interior da lesão periapical. As bactérias Gram-negativas estavam presentes no canal principal, forame apical e na superfície externa do cimento. Essa disseminação microbiana progrediu com o passar do tempo, atingindo, aos 28 dias a superfície externa do cimento (Gram-positivas) e a lesão periapical (Gram-negativas) (Figura 1.7).

Figura 1.7. Distribuição das bactérias Gram-positivas (**A**) e Gram-negativas (**B**), avaliada aos 7, 14, 21 e 28 dias após contaminação dos canais radiculares de molares de camundongos C57Bl6, durante o desenvolvimento da lesão periapical experimental.

A contaminação ou a inoculação de LPS nos canais radiculares modulou diferencialmente a expressão de enzimas e receptores de mediadores lipídicos

Para avaliar possíveis moléculas envolvidas na resposta inflamatória periapical à

contaminação ou à inoculação de LPS nos canais radiculares e, considerando a relevância dos mediadores lipídicos na inflamação, realizamos uma investigação de duas vias importantes do metabolismo do ácido araquidônico: COX-2 e 5-LO.

Com relação à via COX-2, foi observado que o gene *Ptgs2*, que codifica a enzima COX-2, apresentou baixa expressão nos tecidos periapicais de dentes hígidos. Aos 7 dias após a contaminação dos canais radiculares houve um aumento significativo da expressão desse gene, atingindo o pico neste período e se mantendo até 21 dias ($p < 0,05$). A seguir houve uma redução, aos 28 dias, atingindo valores semelhantes à concentração basal observada nos dentes sem lesão periapical ($p > 0,05$). Aos 7 dias após a inoculação de LPS de *E. coli* nos canais radiculares com houve um aumento gradual da expressão do gene *Ptgs2*, atingindo o pico da expressão aos 14 dias ($p < 0,05$). A seguir houve uma redução brusca da expressão até atingir valores semelhantes à concentração basal ($p > 0,05$; Figura 1.8A).

Quanto aos receptores de superfície para PGE₂, a contaminação bucal não modulou a expressão de *Ptger1*, que codifica o receptor EP1, aos 7, 14 e 21 dias ($p > 0,05$), porém inibiu a expressão aos 28 dias ($p < 0,05$). *Ptger2*, que codifica o receptor EP2, foi inibido durante todo o período experimental ($p < 0,05$). Por outro lado, a contaminação bucal estimulou a expressão de *Ptger3*, que codifica o receptor EP3, aos 14 dias da lesão periapical ($p < 0,05$), sem alterar a expressão nos demais períodos experimentais ($p > 0,05$). *Ptger4*, que codifica o receptor EP4, não foi modulado dos 7 aos 21 dias ($p > 0,05$), porém foi inibido aos 28 dias ($p < 0,05$). Diferentemente, a inoculação de LPS nos canais radiculares inibiu a expressão de *Ptger1*, aos 7 dias e estimulou a expressão aos 21 dias e 28 dias ($p < 0,05$). *Ptger2* e *Ptger4*, foram estimulados em todos os períodos experimentais ($p < 0,05$) e *Ptger3* foi inibido aos 7 dias e estimulado aos 21 e 28 dias ($p < 0,05$) (Figura 1.8B-E).

Figura 1.8. Expressão do RNAm para a enzima ciclo-oxigenase-2 (*Ptgs2*) (A) e para os receptores EP1 (*Ptger1*) (B), EP2 (*Ptger2*) (C), EP3 (*Ptger3*) (D) e EP4 (*Ptger4*) (E) para PGE₂, avaliada aos 7, 14, 21 e 28 dias após contaminação dos canais radiculares de molares de camundongos C57Bl6 ou após inoculação de uma solução de LPS. * $p < 0,05$ comparado à produção basal dos genes-alvo em dentes sem lesão periapical (linha tracejada); # $p < 0,05$ comparado ao grupo LPS.

Com relação à via 5-LO, aos 14 dias após a contaminação dos canais radiculares, houve um aumento da expressão do gene *Alox5*, que codifica a enzima 5-LO ($p < 0,05$), retornando ao valor basal após este período ($p > 0,05$). A expressão do gene *Alox5ap*, que codifica a proteína ativadora de 5-LO (FLAP), não foi modulada pela contaminação dos canais radiculares ($p < 0,05$). Diferentemente, após inoculação de LPS nos canais radiculares, houve indução de *Alox5* aos 7 dias e de *Alox5ap* aos 7 e 14 dias ($p < 0,05$). Após estes períodos, houve uma redução da expressão semelhante ao observado nos dentes sem lesão periapical ($p > 0,05$) (Figura 1.9A-B).

Quanto aos receptores de superfície para LTB_4 , a contaminação bucal inibiu *Ltb4r1*, que codifica o receptor BLT1, aos 7, 21 e 28 dias ($p < 0,05$), porém estimulou a expressão de *Ltb4r2*, que codifica o receptor BLT2, aos 14 e 21 dias após a exposição dos canais radiculares ($p < 0,05$). A inoculação de LPS, por outro lado, apresentou um efeito inibitório (7 e 28 dias) e estimulatório (14 e 21 dias) sobre *Ltb4r1* e estimulatório sobre *Ltb4r2* (7, 14 e 21 dias) ($p < 0,05$) (Figura 1.9C-D).

Figura 1.9. Expressão do RNAm para a enzima 5-lipoxigenase (*Alox5*) (A), para a proteína ativadora de 5-lipoxigenase (*Alox5ap*) (B) e para os receptores BLT1 (*Ltb4r1*) (C) e BLT2 (*Ltb4r2*) (D) para LTB_4 , avaliada aos 7, 14, 21 e 28 dias após contaminação dos canais radiculares de molares de camundongos C57Bl6 ou após inoculação de uma solução de LPS. * $p < 0,05$ comparado à produção basal dos genes-alvo em dentes sem lesão periapical (linha tracejada); # $p < 0,05$ comparado ao grupo LPS.

Os ácidos graxos e derivados, incluindo uma variedade de eicosanóides (prostaglandinas e leucotrienos), têm sido identificados como ligantes para os receptores nucleares PPAR. Portanto, investigamos a expressão destes receptores durante a cinética de desenvolvimento da lesão periapical com o objetivo de identificar outros receptores além daqueles de superfície (EP1-EP4 e BLT1-BLT2), que poderiam ser modulados pela contaminação ou inoculação de LPS nos canais radiculares.

A contaminação bucal inibiu a expressão de *Ppara*, que codifica o receptor PPAR α , aos 7 e 28 dias ($p < 0,05$), porém não alterou a expressão aos 14 e 21 dias ($p > 0,05$). *Ppard*, que codifica o receptor PPAR δ , foi induzido aos 14 dias ($p < 0,05$), sem alteração nos demais períodos ($p > 0,05$). *Pparg*, que codifica o receptor PPAR γ , foi inibido em todos os períodos avaliados ($p < 0,05$). A inoculação de LPS, por outro lado, induziu *Ppara* aos 7, 21 e 28 dias ($p < 0,05$), inibiu *Ppard* aos 7 e 28 dias ($p < 0,05$) e induziu *Pparg* aos 21 dias ($p < 0,05$). Nos demais períodos não houve modulação dos receptores nucleares pelo LPS ($p > 0,05$) (Figura 1.10A-C).

Figura 1.10. Expressão do RNAm para os receptores nucleares PPAR α (*Ppara*) (A), PPAR δ (*Ppard*) (B) e PPAR γ (*Pparg*) (C) para mediadores lipídicos, avaliada aos 7, 14, 21 e 28 dias após contaminação dos canais radiculares de molares de camundongos C57Bl6 ou após inoculação de uma solução de LPS. * $p < 0,05$ comparado à produção basal dos genes-alvo em dentes sem lesão periapical (linha tracejada); # $p < 0,05$ comparado ao grupo LPS.

De modo geral, tanto a contaminação bucal como a inoculação de LPS nos canais radiculares, apresentaram um efeito estimulatório na expressão do RNAm para as enzimas COX-2 e 5-LO. Porém, os efeitos na expressão dos receptores de superfície e nucleares para PGE $_2$ e LTB $_4$ foram distintos. Para os receptores EP1, EP2, EP3 e EP4, a contaminação bucal

inibiu ou não modulou sua expressão, enquanto o LPS apresentou um efeito estimulatório. A expressão dos receptores BLT1 e BLT2 foi estimulada pela inoculação de LPS, porém a contaminação bucal induziu somente BLT2. Finalmente, com relação aos receptores PPAR, a contaminação induziu a síntese de RNAm para PPAR δ diferentemente da inoculação de LPS nos canais radiculares que induziu PPAR α e PPAR γ .

DISCUSSÃO

No presente estudo, a contaminação ou a inoculação de LPS nos canais radiculares estimulou a expressão dos genes que codificam as enzimas e receptores envolvidos no metabolismo do ácido araquidônico. O envolvimento das prostaglandinas no desenvolvimento da lesão periapical foi demonstrado previamente, após exposição do tecido pulpar ao meio bucal, por períodos de 7, 14, 21 e 28 dias. Os macrófagos foram identificados como a principal fonte celular responsável pela síntese de prostaglandinas. Ainda, osteoclastos ativos foram observados ao longo da superfície óssea alveolar, sugerindo que as prostaglandinas produzidas pelos macrófagos poderiam modular a atividade dos osteoclastos e contribuir para a atividade reabsortiva nas lesões periapicais (Miyachi *et al.*, 1996; Martinho *et al.*, 2012). Da mesma maneira, após indução de lesão periapical em dentes de ratos, por meio da contaminação bucal durante 5, 10, 15 e 20 dias, foi observado que macrófagos e osteoblastos mostraram marcações positivas para COX-2, aumentando significativamente a sua expressão durante o decorrer do período analisado (Lin *et al.*, 2002). Estes resultados são divergentes daqueles encontrados no presente estudo, uma vez que a expressão gênica foi maior nos períodos iniciais do desenvolvimento da lesão periapical, independentemente da indução ter sido realizada com LPS ou contaminação bucal.

A administração de indometacina, um potente inibidor não-seletivo das enzimas COX-1 e COX-2, durante 6 semanas, preveniu a reabsorção óssea periapical (Oguntebi *et al.*, 1989) demonstrando que as prostaglandinas desempenham um papel catabólico no metabolismo do tecido ósseo frente a invasão bacteriana dos canais radiculares. Embora no presente estudo o LPS não tenha induzido a reabsorção óssea periapical, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a inoculação de LPS nos canais radiculares leva ao aumento de expressão de

RANK e RANKL, mediadores importantes da osteoclastogênese. Após administração de Indometacina ou de Celecoxibe, inibidor seletivo de COX-2, e inoculação de LPS nos canais radiculares, houve inibição da sinalização osteoclastogênica, sem efeito na reabsorção óssea (Santos, 2015).

A maior parte das ações mediadas pela PGE₂ são exercidas após ativação de um de seus receptores de superfície denominados EP1, EP2, EP3 e EP4 (Narumiya *et al.*, 1999; Sugimoto e Narumiya, 2007). Estudos de clonagem de cDNA mostraram que todos estes receptores possuem sete domínios transmembrana característicos de receptores acoplados à proteína G, embora cada um deles seja codificado por um gene específico (*Ptger1*, *Ptger2*, *Ptger3* e *Ptger4*), e promovam respostas celulares pela ativação de diferentes tipos de proteína G. Neste estudo foi observado um aumento na expressão de todos os receptores para PGE₂, após a inoculação de LPS nos canais radiculares, quando comparados ao grupo controle. A contaminação dos canais radiculares inibiu ou não modulou a expressão dos receptores EP1-EP4, exceto *Ptger3* que foi induzido aos 14 dias.

Os metabólitos derivados da via 5-LO também podem representar importantes mediadores do recrutamento celular, inflamação tecidual e reabsorção óssea (Meghji *et al.*, 1992; Gallwitz *et al.*, 1993; Lin e O'Connor, 2014). Especificamente, dois produtos da via 5-LO (Leucotrienos B₄ e C₄) foram identificados em lesões periapicais de humanos (McNicholas *et al.*, 1991; Torabinejad *et al.*, 1992; Cotti e Torabinejad, 1994; Eder *et al.*, 2012) e maior expressão de LTB₄ estava positivamente correlacionada clinicamente à presença de sintomatologia dolorosa e histologicamente à presença de células inflamatórias polimorfonucleadas (Torabinejad *et al.*, 1992). No presente estudo foi observado um aumento da expressão do gene *Alox5*, que codifica a enzima 5-LO, após inoculação de LPS ou contaminação dos canais radiculares, havendo uma diminuição da expressão do RNAm para esta enzima aos 21 e 28 dias. Quanto aos receptores para LTB₄, a contaminação bucal induziu a expressão gênica do receptor nuclear PPAR δ e do receptor de superfície BLT2, porém inibiu a expressão gênica de BLT1, PPAR α e PPAR γ . Sabendo que o reconhecimento dos micro-organismos pelas células do sistema imune inato é mediada por receptores de reconhecimento padrão e a partir daí são gerados sinalizadores secundários que transduzem os sinais da superfície celular, hipotetizamos que os produtos da via-5LO podem atuar tanto no meio extracelular como diretamente no interior da célula para desencadeamento da resposta do hospedeiro. Em modelo de doença periodontal induzida por ligadura, o

tratamento com um agonista do receptor nuclear PPAR δ (GW0742) gerou menor produção de citocinas inflamatórias e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), menor apoptose e menor dano tecidual, indicando que esse receptor medeia eventos anti-inflamatórios (Di Paola *et al.*, 2011).

Em estudos prévios, a inoculação de LPS em modelo de doença periodontal (Vardar *et al.*, 2005; Oka *et al.*, 2012) ou para indução de lesão periapical (Silva *et al.*, 2002; Chuang *et al.*, 2012) resultaram em aumento da função osteoclástica e reabsorção óssea diferentemente do observado no presente estudo. Essa divergência pode ser atribuída a dois fatores importantes. O primeiro diz respeito à concentração de LPS utilizada neste estudo foi de 0,1 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$, que resultou em uma massa de aproximadamente 1 μg de LPS por dente, comparado à 25 μg utilizado em estudo prévio (Chuang *et al.*, 2012). Outro fator importante é o tempo necessário para indução da reabsorção periapical. O presente estudo foi realizado em 28 dias o que pode não ter sido suficiente para detectar o efeito do LPS, na concentração utilizada, na reabsorção óssea.

A contaminação dos canais radiculares de dentes molares de camundongos C57Bl6 por micro-organismos advindos da cavidade bucal ou pelo LPS induziram o desenvolvimento da lesão periapical experimental com características distintas, porém ambas foram caracterizadas por um aumento local na síntese de RNAm para as enzimas 5-lipoxigenase e ciclo-oxigenase-2 do metabolismo do ácido araquidônico. Tendo em vista que a contaminação microbiana dos canais radiculares induziu a inflamação periapical e a reabsorção óssea diferentemente do LPS, e que os receptores de superfície (EP1-EP4) para prostaglandina E₂ foram pouco modulados, aprofundamos nossa investigação no sentido de entender o papel da via 5-LO na síntese de mediadores inflamatórios e reabsorção óssea apical após contaminação microbiana dos canais radiculares.

CAPÍTULO 2

REGULAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS, SINALIZAÇÃO OSTEOCLASTOGÊNICA E PAPEL DA VIA 5-LIPOXIGENASE NA LESÃO PERIAPICAL INDUZIDA PELA CONTAMINAÇÃO DOS CANAIS RADICULARES

A progressão da necrose tecidual em direção à região apical, concomitantemente à contaminação dos canais radiculares, leva ao recrutamento de células inflamatórias para os tecidos periapicais (Paula-Silva *et al.*, 2009; Martón e Kiss, 2014). Em humanos, nos dentes com lesão periapical, estes micro-organismos que invadem os canais radiculares se difundem amplamente pelo sistema de canais e nas lacunas de reabsorção do cimento, seja na forma isolada ou formando extensos biofilmes microbianos (Leonardo *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2008). A contaminação dos canais radiculares inicialmente gera uma resposta inflamatória de defesa, porém se não controlada, é evolutiva e resulta na degradação dos componentes da matriz extracelular e reabsorção do tecido ósseo (Eberhard e Plagmann, 1999; Martón e Kiss, 2014).

O recrutamento de células inflamatórias nas regiões apical e periapical é ocasionado pela liberação local de fatores quimiotáticos (quimicinas) e citocinas, como a interleucina-1 α (IL-1 α) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Stashenko, 1990; Wang e Stashenko, 1991; Wang e Stashenko, 1993; Silva *et al.*, 2007). Na presença de infiltrado inflamatório periapical, dois padrões de resposta podem ser gerados, o tipo T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2), caracterizados pela produção de interleucina-2 (IL-2), interleucina-12 (IL-12) e interferon gama (INF- γ), e por interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13), respectivamente (Jankovic, 2001; Yamasaki *et al.*, 2006; De-Rossi *et al.*, 2008; Teixeira-Salum *et al.*, 2010; Brito *et al.*, 2012; Carvalho-Fraga *et al.*, 2013; Araújo-Pires *et al.*, 2014). Diversos micro-organismos, incluindo bactérias, induzem o recrutamento de células Th1, as quais produzem IFN- γ , citocina responsável pela ativação de macrófagos para executarem a fagocitose e destruição microbiana (Campos *et al.*, 2013; Bambirra *et al.*, 2015). Em conjunto, algumas destas citocinas induzem localmente a reabsorção do tecido ósseo e podem estimular à distância, uma resposta de fase aguda (Paula-Silva *et al.*, 2010; Segura-Egea *et al.*, 2015; Sasaki *et al.*, 2016), a qual envolve efeitos locais e sistêmicos, dentre eles a vasodilatação, liberação de radicais livres, febre, alterações

metabólicas e a síntese hepática da proteína C-Reativa (Ramadori e Christi, 1999; Henrichi *et al.*, 1990; Richardson e Emery, 1996; Garrido *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015).

Dentre os mediadores inflamatórios locais, os leucotrienos são amplamente reconhecidos por suas funções biológicas, entre as quais uma eficiente ação quimiotática, agregação e degranulação de polimorfonucleares, indução da fagocitose bem como estimulação da aderência dos leucócitos na parede endotelial para transmigração do infiltrado inflamatório (Peters-Golden e Henderson-Junior, 2007; Pidgeon *et al.*, 2007; Wymann e Schneider, 2008; Medeiros *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 2009; Rådmark e Samuelsson, 2009, 2010; Singh *et al.*, 2010; Boudreau *et al.*, 2011; Thomas e Puleo, 2011; Le Bel *et al.*, 2014; Secatto *et al.*, 2014; Zoccal *et al.*, 2016). Os leucotrienos são sintetizados por meio da ativação da enzima 5-lipoxigenase pela proteína ativadora da enzima 5-lipoxigenase (FLAP), o substrato derivado dos fosfolipídeos da membrana celular é inicialmente convertido em 5-hidroperoxiaraquidonato (5-HPETE) e posteriormente em leucotrieno A₄ (LTA₄). O LTA₄ por sua vez pode ser convertido em leucotrieno B₄ (LTB₄) pela ação da enzima LTA₄-hidrolase ou convertido em cisteinil leucotrieno C₄ (LTC₄) após a adição de glutadiona ao LTA₄ pela enzima LTC₄-sintase. Os LTB₄ e LTC₄ são secretados e o último pode ser convertido em LTD₄ e LTE₄ pela hidrólise sequencial de aminoácidos (Murphy e Gijón, 2007; Rådmark *et al.*, 2015). Estes mediadores ativam cascatas quinases levando a diversos eventos celulares incluindo desde a mobilidade celular até a transcrição gênica (Tager e Luster, 2003; Kanaoka e Boyce, 2004; Zoccal *et al.*, 2014; Zoccal *et al.*, 2015).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que a inibição da síntese de leucotrienos por meio de um medicamento (MK-886) apresenta um papel dual na sinalização osteoclastogênica, inibindo a formação de osteoclastos em períodos precoces porém estimulando em períodos tardios (Paula-Silva *et al.*, 2016). A regulação de algumas citocinas e quimiocinas mostrou uma correlação positiva com a modulação da osteoclastogênese, sugerindo que este grupo de mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico podem ser importantes em eventos inflamatórios periapicais. Porém o efeito na regulação de uma ampla diversidade de mediadores inflamatórios e na reabsorção óssea periapical merece investigação mais profunda, especialmente em relação à produção de mediadores com as populações celulares precursoras de osteoclastos presentes no sítio da inflamação. O conhecimento de potenciais sinalizadores bioquímicos envolvidos na osteoclastogênese pode representar possíveis mecanismos de controle da expansão da lesão periapical e reabsorção

óssea associada.

Dessa maneira, objetivo deste estudo foi investigar a regulação de mediadores inflamatórios, a sinalização osteoclastogênica e o papel da via 5-lipoxigenase na lesão periapical induzida pela contaminação dos canais radiculares. Especificamente, foram investigados possíveis mediadores inflamatórios modulados durante a formação da lesão periapical e o efeito da ausência da 5-LO na síntese destes mediadores, na osteoclastogênese e reabsorção periapical resultante da inflamação não controlada.

METODOLOGIA

Animais

Os protocolos utilizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais, do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP) (processo CEUA nº 12.1.60.53.8). Foram utilizados 96 camundongos *knockout* para a enzima 5-lipoxigenase (129-Alox5^{tm1Fun}; 129-Alox5^{-/-}; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EUA, Anexo C) e animais selvagens (*wild type*; 129), machos, com 6 a 8 semanas de idade, pesando de 20 a 22 gramas, provenientes do Biotério II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Para os procedimentos operatórios os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (150 mg / kg; Ketamina 10%; Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP) e xilazina (7,5 mg / kg; Dopaser, Laboratórios Calier S/A, Barcelona, Espanha) por via intramuscular na coxa traseira. Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, alocados em gaiolas de polipropileno e tampas de aço inoxidável perfurado, de 15 × 20 cm (3 animais por gaiola), forradas com maravalha, em temperatura de 22° C e umidade relativa do ar (55 ± 10%) constantes, em um ciclo de claro-escuro de 12 : 12 horas, durante todo o período experimental, com dieta padrão de laboratório e livre acesso à água autoclavada.

Indução da lesão periapical

Foram induzidas lesões periapicais em camundongos posicionados em uma mesa

cirúrgica com dispositivo para retração mandibular, permitindo a imobilização dos animais e manutenção da boca aberta, para acesso aos dentes molares. A abertura coronária foi realizada pela face oclusal nos primeiros molares inferiores e superiores, utilizando uma ponta diamantada esférica tamanho 1011 (KG Sorensen Ind. Com. Ltda., Barueri, SP). A seguir, os canais radiculares foram localizados por meio de uma lima tipo K número 06 (Les Fils d'Auguste Maillefer S/A, Suíça) e a polpa radicular removida. Os canais radiculares foram expostos ao ambiente bucal, como descrito previamente (Paula-Silva *et al.*, 2016). Dentes hígidos, sem exposição pulpar, foram utilizados como controle. Os camundongos foram eutanasiados em uma câmara de CO₂ aos 7, 14, 21 e 28 dias após contaminação dos canais radiculares (n= 12 dentes por período). Os animais foram acompanhados ao longo do tempo para avaliação do peso corporal e mortalidade. Os grupos foram comparados entre si por meio do teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Sidak ($\alpha= 0,05$).

Processamento histológico

Os molares inferiores foram utilizados para processamento histológico. As mandíbulas foram dissecadas e removidas com uma tesoura cirúrgica. Os blocos contendo dente e osso foram fixados em formol tamponado a 10% por 24 horas, a temperatura ambiente e desmineralizados em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA; Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ) a 10%, pH 7,4, por aproximadamente 21 dias. Após a desmineralização, as peças foram submetidas à técnica histológica de rotina, sendo lavadas em água corrente por 24 horas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os blocos foram seccionados longitudinalmente, em sentido vestibulo-lingual, para obtenção de cortes com espessura de 5 μ m. As lâminas obtidas foram coradas pela hematoxilina e eosina (HE) para avaliação histopatológica e histométrica e marcadas para a enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato para análise histoenzimológica.

Avaliação histopatológica e histométrica

Os cortes histológicos corados por HE foram avaliados por microscopia de luz convencional e realizada a mensuração das lesões periapicais (Zeiss Axio Imager, Carl Zeiss AG Light Microscopy, Göttingen, Alemanha), de acordo com parâmetros descrito previamente (Paula-Silva *et al.*, 2009; Santos, 2015; Paula-Silva *et al.*, 2016). Para a análise morfométrica

do tamanho das lesões periapicais foi utilizada videomicroscopia com o Software Zeiss AxioVision (Carl Zeiss AG Light Microscopy), em conjunto com o microscópio e videocâmara AxioCam MRc5 (Carl Zeiss AG Light Microscopy), no aumento de 10×. Para cada espécime, a área da lesão periapical foi delineada e medida em μm^2 nas lâminas que representavam o maior diâmetro da lesão. A delimitação da lesão excluiu as estruturas intactas (ligamento periodontal, cimento e osso alveolar), e incluiu áreas de reabsorção e infiltrado inflamatório. Os grupos foram comparados entre si por meio do teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Sidak ou Dunnett ($\alpha = 0,05$).

A avaliação histopatológica foi realizada subjetivamente, por um examinador calibrado, sem conhecimento prévio a que grupo pertencia cada espécime. Os dados foram apresentados na forma descritiva.

Determinação da presença e atividade de osteoclastos por meio de histoenzimologia para a enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP)

As secções de tecido desparafinado foram incubadas em solução contendo 8 mg de naftol AS-MX sal fosfato di-sódico (Sigma- Aldrich) em 500 μL de N-N-dimetilformamida seguido pela adição de 50 mL de uma solução-tampão de 0,2 mol / L de acetato de sódio (pH 5,0) contendo 70 mg de Fast Red ITR (Sigma- Aldrich). A seguir o substrato tartarato de sódio diidratado (50 mmol / L) foi adicionado à solução e incubado a 37°C por 12 horas. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada e coradas por Hematoxilina. Como controle, lâminas foram incubadas com meio sem substrato. A análise quantitativa do número de osteoclastos positivos para a enzima TRAP foi determinada levando em consideração a quantidade total de osteoclastos por lesão periapical. Os grupos foram comparados entre si por meio do teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Sidak ou Dunnett ($\alpha = 0,05$).

Determinação da atividade inflamatória por meio da avaliação da expressão gênica por RT-PCR arrays

Extração do RNA

Para extração do ácido ribonucleico (RNA) total foi utilizado um *pool* contendo 3 dentes molares superiores, com peso total médio de 30 mg, por meio do RNeasy Mini kit, um

protocolo de extração à base de tiocianato de guanidina (RNeasy® Mini, Qiagen Inc., Valencia, EUA). Os blocos contendo dente e osso foram macerados com auxílio de pinça hemostática e triturados com um homogeneizador de tecidos, em tubos de 2,0 mL esterilizados e livres de RNase (Axygen Inc., NY, EUA), contendo 594 µL de solução tampão de lise RLT e 6 µL de beta-mercaptoetanol (βME). A seguir os tubos foram centrifugados em microcentrífuga (Microcentrífuga modelo 5417R; Eppendorf AG, Hamburg, Germany), a 10.000 rpm, por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 1 volume de etanol a 70%, preparado com água livre de RNase, com a finalidade de fornecer condição apropriada para ligação do RNA à membrana contida na coluna purificação. A seguir 600 µL da solução foram transferidos para uma coluna contendo um tubo coletor acoplado e os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 15 segundos. O filtrado foi descartado e os 600 µL restantes da solução foram transferidos para a coluna e centrifugados novamente. O filtrado foi descartado, 350 µL da solução tampão RW1 foram adicionados à coluna e os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 15 segundos. A seguir 10 µL de DNase I foram diluídos em 70 µL de solução tampão RDD (RNase-Free DNase Set; Qiagen Inc.), o volume total foi adicionado à membrana presente na coluna e as colunas foram incubadas a 25° C, por 15 minutos, para eliminar a possível contaminação com DNA genômico. A seguir 350 µL da solução tampão RW1 foram adicionados à coluna e os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 15 segundos. Posteriormente 500 µL de solução tampão RPE contendo etanol foram adicionados à coluna e os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 15 segundos. Novamente 500 µL de solução tampão RPE contendo etanol foram adicionados à coluna e os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 2 minutos. Com a finalidade de eliminar a possibilidade de carregar remanescentes de solução tampão RPE contendo etanol para as etapas seguintes, o tubo coletor foi descartado, um novo tubo coletor foi inserido na coluna e os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm, por 1 minuto. O tubo coletor foi descartado, um tubo de 1,5 mL foi acoplado à coluna e o RNA presente na membrana foi eluído em 35 µL de água livre de RNase.

A qualidade do RNA total foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% (Sigma-Aldrich Corp.) contendo brometo de etídeo (Sigma-Aldrich Corp.), utilizando tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) concentrado 1×. Foram analisadas as duas bandas correspondentes ao RNA ribossomal 28S e 18S e o RNA foi considerado de boa qualidade quando a relação 28S/18S era igual ou maior que 2. A pureza e estimativa da quantidade de ácidos nucleicos foi analisada

utilizando espectrofotometria em NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA), nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm.

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

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

A análise global da expressão gênica foi realizada por meio de RT-PCR *arrays* específicos para citocinas e mediadores da inflamação (*Inflammatory Cytokines and Receptors* - PAMM-011Z, Qiagen Inc.), contendo 84 sequências-alvo (Tabela 2.1 e Anexo D). Os genes *Gusb*, *Hprt*, *Hsp90ab1*, *Actb* e *Gapdh* foram utilizados como referência. Foram incluídos, em cada placa, controles para detecção de contaminação por DNA genômico de camundongos (MGDC), controles para testar a eficiência da reação de transcrição reversa (RTC) e o controles positivos (PPC) que consistem em uma sequência de DNA artificial passível de ser detectada durante a reação.

Para cada amostra, 102 µL de cDNA foram adicionados a 1350 µL de RT² SYBR Green Master Mix 2× e acrescido de água livre de RNase para um volume final de 2700 µL. Desta solução, 25 µL foram depositados em cada poço da placa de PCR, o qual continha um par de *primers* específico para a sequência-alvo. Para as reações de qRT-PCR foram realizados dois experimentos independentes, em duplicata, utilizando o Eppendorf Mastercycler® Realplex (Eppendorf AG).

Para a reação de qRT-PCR foi utilizado o fluoróforo SYBR Green que intercala na dupla fita de cDNA durante a amplificação. Assim, o número de cópias amplificadas de um determinado gene é proporcional à fluorescência quantificada pelo equipamento. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: ativação da polimerase HotStart DNA Taq Polymerase a 95° C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de 95° C por 15 segundos para

desnaturação do DNA e 60° C por 1 minuto para anelamento dos *primers* e polimerização. Ao final da reação, foi avaliada a curva de dissociação (*Melting curve*) para determinação da especificidade dos *primers* considerando a temperatura de fusão dos *amplicons*, sob as seguintes condições: aumento da temperatura a 95° C por 15 segundos, seguido por redução da temperatura a 60°C por 15 segundos, aumento gradual da temperatura até 95° C por 20 minutos e manutenção a 95° C por 15 minutos.

Os resultados foram analisados com base no valor de cada Ct, para cada RNAm. Para normalizar os valores de Ct, de forma a considerar diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, o Ct determinado para uma amostra foi subtraído da média geométrica dos Cts dos genes de referência da mesma amostra, gerando assim o ΔCt . Para cada gene, o cálculo de expressão relativa foi realizado a partir da diferença entre o ΔCt das amostras e o ΔCt apresentado pelo controle ($\Delta\Delta Ct$), com base na equação: *Expressão relativa* = $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os grupos foram comparados entre si por meio do teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Sidak ou pós-teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$).

Tabela 2.1. Genes avaliados pelo RT-PCR *array* agrupados de acordo com a sua função

Quimiocinas	<i>Ccl1 (I-309), Ccl2 (Mcp-1), Ccl3 (Mip-1a), Ccl4 (Mip-1b), Ccl5 (Rantes), Ccl6, Ccl7 (Mcp-3), Ccl8 (Mcp-2), Ccl9, Ccl11, Ccl12, Ccl17 (Tarc), Ccl19, Ccl20 (Mip-3a), Ccl22, Ccl24 (Eotaxin-2), Ccl25, Cxcl1 (Il8ra), Cxcl5 (Ena-78/Lix), Cxcl9, Cxcl10 (Inp10), Cxcl11 (I-Tac/Ip-9), Cxcl12 (Sdf1), Cxcl13, Cxcl15, Cx3cl1, Xcr1.</i>
Receptores para quimiocinas	<i>Ccr1, Ccr2, Ccr3, Ccr4, Ccr5, Ccr6, Ccr7, Ccr8, Ccr9, Ccr10, Cxcr2, Cxcr3, Cxcr5.</i>
Interleucinas	<i>Il1a, Il1b, Il1f6, Il1f8, Il3, Il4, Il10, Il11, Il13, Il15, Il16, Il17b, Il18, Il20.</i>
Receptores para interleucinas	<i>Il1r1, Il1r2, Il2rb, Il2rg, Il5ra (Cd125), Il6ra, Il6st (Gp130), Il10ra, Il10rb, Il13ra1.</i>
Outros mediadores e receptores	<i>Abcf1, Aimp1 (Scye1), Bcl6, C3, Caps1, Cd40lg (Tnfsf5), Crp, Ifng, Itgam, Itgb2, Lta (Tnfb), Ltb, Mif, Pf4, Spp1 (Osteopontin), Tnf, Tnfrsf1a, Tnfrsf1b, Tollip.</i>

Avaliação da expressão gênica de enzimas e receptores do metabolismo da via 5-LO e de mediadores da osteoclastogênese por meio de reação da polimerase em cadeia em tempo real (qRT-PCR)

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

Para as reações de qRT-PCR pelo sistema TaqMan®, após a extração do RNA total, o cDNA foi sintetizado por meio de uma reação de transcrição reversa, a partir de 1 µg de RNA total, utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e o equipamento Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems). Em um tubo de 0,1 mL (Axygen Inc.), o RNA foi incubado com 2,0 µL de solução tampão 10×, 0,8 µL de dNTP mixture 25× (100mM), 2,0 µL de *random primers* 10×, 1,0 µL da enzima *Multiscribe™ Reverse Transcriptase* (50 U/ µL), 1,0 µL de inibidor de RNase e acrescido de água livre de RNase para um volume final de 20 µL. As amostras foram incubadas a 25° C por 10 minutos para ligação do *primer* ao RNA, seguido por incubação a 37° C por 2 horas para transcrição reversa e posterior incubação a 85° C por 5 segundos para inativação da enzima transcriptase. O cDNA resultante foi armazenado a -20° C até o momento do uso.

Para as reações de qRT-PCR, alíquotas de 2 µl (50 ng) de cDNA foram adicionadas a 10,0 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2×, 1,0 µL de TaqMan Gene Expression Assay 20× (par de *primers* + sonda) e acrescido de água livre de RNase para um volume final de 20 µL / poço. *Primers* e sondas para *Alox5* (Mm01182747), *Alox5ap* (Mm00802100), *Ltb4r1* (Mm02619879), *Ltb4r2* (Mm01321172), *Ppara* (Mm00440939), *Ppard* (Mm00803184), *Pparg* (Mm01184322), *Tnfrsf11a* (Mm00437135), *Tnfrsf11* (Mm00441906) e *Tnfrsf11b* (Mm01205928) foram obtidos comercialmente e são propriedades privadas, portanto as sequências não estão disponíveis (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems). O gene para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*; Mm99999915) foi utilizado como referência. Para as reações de qRT-PCR foram realizados dois experimentos independentes, em duplicata, utilizando o equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems) e o *Software* Step One versão 2.2.3 (Applied Biosystems).

A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: ativação da polimerase AmpliTaq Gold Enzyme a 95 °C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 1 segundos para desnaturação do DNA e 60°C por 20 segundos para anelamento do *primer* e polimerização. Os resultados foram analisados com base no valor do ciclo limiar (Ct, *cycle*

threshold). Como controle negativo foi utilizada água destilada deionizada, submetida à reação com cada par das sequências dos *primers* e sondas utilizados.

Para normalizar os valores de Ct, o Ct determinado para uma amostra foi subtraído do Ct do gene de referência (*Gapdh*) da mesma amostra, gerando assim o ΔCt . Para cada gene, o cálculo de expressão relativa foi realizado a partir da diferença entre o ΔCt das amostras e o ΔCt apresentado pelo controle ($\Delta\Delta Ct$), com base na equação: *Expressão relativa* = $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os grupos foram comparados entre si por meio do teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Sidak ou Dunnett ($\alpha = 0,05$) ou pelo teste ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$).

RESULTADOS

A contaminação dos canais radiculares induziu a expressão do RNAm para proteínas e receptores da via 5-LO

Os experimentos para confirmar a modulação da via 5-LO após contaminação bucal dos canais radiculares de animais selvagens foram realizados pois a linhagem a partir da qual os animais geneticamente modificados foi produzida não é a linhagem C57Bl6 utilizada nos experimentos anteriores, mas sim a linhagem 129 (*wild type*).

A indução da lesão periapical por meio da contaminação bucal dos canais radiculares não alterou o peso dos animais 129-Alox5^{-/-} e dos animais selvagens em nenhum período experimental e foi semelhante ao de animais não submetidos à infecção ($p > 0,05$). Entretanto, foi observado um ganho de peso ao longo do tempo, sem diferença entre os grupos ($p > 0,05$; Figura 2.1A). O desenvolvimento da lesão periapical também não influenciou a sobrevivência dos animais em função do tempo ($p > 0,05$; Figura 2.1B).

Figura 2.1. Representação gráfica do peso (A) e sobrevivência (B) em função do tempo, após contaminação dos canais radiculares de molares de camundongos deficientes para a enzima 5-LO (129-Alox5^{-/-}) e camundongos selvagens (129). Camundongos hígidos foram utilizados como controle.

A contaminação microbiana dos canais radiculares induziu o aumento da expressão do gene *Alox5* que codifica a enzima 5-LO aos 14 dias após abertura coronária ($p < 0,05$), à semelhança do que foi observado para os animais C57Bl6, porém a síntese do RNAm para a enzima foi inibida aos 7 e 28 dias em relação à expressão em dentes hígidos ($p < 0,05$). Interessantemente, a expressão do gene *Alox5ap*, que codifica a proteína ativadora de 5-LO (FLAP) seguiu o mesmo padrão de expressão de *Alox5*, com aumento significativo aos 14 dias após a contaminação dos canais radiculares ($p < 0,05$), sem alteração nos demais períodos (Figura 2.2A-B).

Quanto aos receptores de superfície para LTB₄, a contaminação bucal inibiu *Ltb4r1*, que codifica o receptor BLT1, em todos os períodos avaliados ($p < 0,05$) e não exerceu nenhum efeito na expressão de *Ltb4r2*, que codifica o receptor BLT2 ($p > 0,05$), exceto pela inibição aos 14 dias ($p < 0,05$) (Figura 2.2C-D). Com relação aos receptores nucleares, a contaminação bucal inibiu a expressão de *Ppara* ($p < 0,05$), que codifica o receptor PPAR α , diferentemente de *Ppard*, que codifica o receptor PPAR δ , que foi induzido ($p < 0,05$) em todos os períodos avaliados. *Pparg*, que codifica o receptor PPAR γ , foi inibido aos 7, 14 e 28 dias ($p < 0,05$), sem alteração na expressão aos 21 dias ($p > 0,05$) (Figura 2.2E-G).

Figura 2.2. Expressão do RNAm para a enzima 5-lipoxigenase (*Alox5*) (A), para a proteína ativadora de 5-lipoxigenase (*Alox5ap*) (B), para os receptores de superfície BLT1 (*Ltb4r1*) (C) e BLT2 (*Ltb4r2*) (D) para LTB₄ e para os receptores nucleares PPAR α (*Ppara*) (E), PPAR δ (*Ppard*) (F) e PPAR γ (*Pparg*) (G) para mediadores lipídicos, avaliada aos 7, 14, 21 e 28 dias após contaminação dos canais radiculares de molares de camundongos 129 (*wild type*). * $p < 0,05$ comparado à produção basal dos genes-alvo em dentes sem lesão periapical (linha tracejada).

Diversos mediadores inflamatórios são induzidos pela contaminação dos canais radiculares e na ausência da via 5-LO têm sua produção inibida

Dos 84 genes avaliados que codificam citocinas, quimiocinas, receptores e outros mediadores inflamatórios, 35 foram inibidos ou induzidos pela contaminação dos canais radiculares em camundongos selvagens (129) ou deficientes para a enzima 5-LO (129-Alox5^{-/-}) (Figuras 2.3 a 2.8). Os demais genes (49) foram pouco modulados e foram apresentados nas Tabelas Suplementares 1 e 2 (Apêndice).

Nos animais selvagens, aos 7 dias após a contaminação bucal, houve indução da expressão de *Ccl1*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl8*, *Ccl12*, *Ccl17*, *Ccl25*, *Cxcl5*, *Cxcl10*, *Cx3cl1*, *Ccr7*, *Ccr8*, *Ccr9*, *Il1a*, *Il1b*, *Il10*, *Il13*, *Il20*, *Il1r1*, *Infg*, *Mif* e *Crp* ($p < 0,05$), comparado aos dentes hígidos não submetidos à exposição pulpar. Aos 14 dias, houve indução de *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl8*, *Ccl12*, *Ccl17*, *Ccl20*, *Ccl25*, *Cxcl5*, *Cxcl10*, *Cxcl15*, *Cx3cl1*, *Ccr6*, *Ccr8*, *Ccr9*, *Il1b*, *Il10*, *Il13*, *Il20*, *Il1r2*, *Infg*, *Mif* e *Tollip* ($p < 0,05$). Aos 21 dias, houve indução de *Ccl1*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl8*, *Ccl17*, *Ccl25*, *Cxcl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Cxcl13*, *Ccr6*, *Ccr8*, *Ccr9*, *Il1b*, *Il13*, *Il20*, *Il1r2*, *Infg* e *Mif* ($p < 0,05$). Aos 28 dias, houve indução de *Ccl1*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Ccl8*, *Ccl12*, *Ccl17*, *Ccl20*, *Ccl25*, *Cxcl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Cxcl13*, *Cxcl15*, *Cx3cl1*, *Ccr6*, *Ccr7*, *Ccr8*, *Ccr9*, *Cxcr5*, *Il1b*, *Il10*, *Il13*, *Il20*, *Il1r2*, *Infg*, *Mif* e *Tollip* ($p < 0,05$). *Cxcr2*, por outro lado, foi inibido durante todos os períodos experimentais ($p < 0,05$).

Nos animais deficientes para a enzima 5-LO (129-Alox5^{-/-}), no período de 7 dias após contaminação dos canais radiculares, 13 genes foram induzidos na região periapical, dentre eles *Ccl3*, *Ccl5*, *Ccl6*, *Ccl9*, *Ccl25*, *Cxcl9*, *Cxcl11*, *Ccr7*, *Cxcr2*, *Il1a*, *Il10*, *Il1r1* e *Il1r2*, comparado aos animais selvagens (129) ($p < 0,05$). Por outro lado, 14 genes foram inibidos: *Ccl1*, *Ccl4*, *Ccl8*, *Ccl12*, *Ccl17*, *Cxcl5*, *Ccr9*, *Il1b*, *Il13*, *Il20*, *Infg*, *Mif*, *Crp* e *Tollip* ($p < 0,05$).

Aos 14 dias, 7 genes foram estimulados lesões periapicais em animais 129-Alox5^{-/-}, comparado as animais selvagens (129). Destes, o efeito foi mais notável na expressão do RNAm para *Ccl3*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl11*, *Ccr7*, *Cxcr2* e *Infg* ($p < 0,05$). Por outro lado, 15 genes foram inibidos, dentre eles *Ccl8*, *Ccl17*, *Ccl20*, *Ccl25*, *Cxcl5*, *Cxcl15*, *Cx3cl1*, *Ccr9*, *Cxcr5*, *Il1b*, *Il13*, *Il20*, *Mif*, *Crp* e *Tollip* ($p < 0,05$).

Aos 21 dias, 9 genes foram estimulados lesões periapicais em animais 129-Alox5^{-/-}, comparado as animais selvagens (129): *Ccl5*, *Cxcl11*, *Ccr7*, *Cxcr2*, *Il1a*, *Il1b*, *Il10*, *Il1r1* e *Il1r2* ($p < 0,05$). Diferentemente, 18 genes foram inibidos, dentre eles *Ccl1*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl8*, *Ccl17*, *Ccl25*, *Cxcl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl13*, *Cx3cl1*, *Ccr6*, *Ccr8*, *Ccr9*, *Il13*, *Il20*, *Infg* e *Crp* ($p < 0,05$).

Aos 28 dias, 2 genes foram estimulados lesões periapicais em animais 129-Alox5^{-/-}, comparado as animais selvagens (129): *Ccl9* e *Il1r2* ($p < 0,05$). Por outro lado, 23 genes foram

inibidos, dentre eles *Ccl1*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Ccl8*, *Ccl12*, *Ccl17*, *Ccl20*, *Cxcl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Cxcl13*, *Cxcl15*, *Ccr6*, *Ccr8*, *Ccr9*, *Cxcr5*, *Il1b*, *Il13*, *Il20*, *Infg*, *Mif* e *Crp*.

Figura 2.3. Expressão do RNAm para as quimiocinas CCL1 (A), CCL3 (B), CCL4 (C), CCL5 (D), CCL6 (E) e CCL8 (F), avaliada aos 7, 14, 21 e 28 dias após contaminação dos canais radiculares de molares de camundongos 129 (wild type) e *knockout* para a enzima 5-lipoxigenase (129-Alox5^{-/-}). * $p < 0,05$ comparado à produção basal dos genes-alvo em dentes sem lesão periapical (linha tracejada) e # $p < 0,05$ comparado aos animais 129 (wild type).

Figura 2.4. Expressão do RNAm para as quimiocinas CCL9 (A), CCL12 (B), CCL17 (C), CCL20 (D) e CCL25 (E), avaliada aos 7, 14, 21 e 28 dias após contaminação dos canais radiculares de molares de camundongos 129 (*wild type*) e *knockout* para a enzima 5-lipoxigenase (129-Alox5^{-/-}). * $p < 0,05$ comparado à produção basal dos genes-alvo em dentes sem lesão periapical (linha tracejada) e # $p < 0,05$ comparado aos animais 129 (*wild type*).

Figura 2.5. Expressão do RNAm para as quimiocinas CXCL5 (A), CXCL9 (B), CXCL10 (C), CXCL11 (D), CXCL13 (E), CXCL15 (F) e CXCL1 (G), avaliada aos 7, 14, 21 e 28 dias após contaminação dos canais radiculares de molares de camundongos 129 (*wild type*) e *knockout* para a enzima 5-lipoxigenase (129-Alox5^{-/-}). * $p < 0,05$ comparado à produção basal dos genes-alvo em dentes sem lesão periapical (linha tracejada) e # $p < 0,05$ comparado aos animais 129 (*wild type*).

Figura 2.6. Expressão do RNAm para os receptores de quimiocinas CCR3 (A), CCR7 (B), CCR8 (C), CCR9 (D), CXCR2 (E) e CXCR5 (F), avaliada aos 7, 14, 21 e 28 dias após contaminação dos canais radiculares de molares de camundongos 129 (*wild type*) e *knockout* para a enzima 5-lipoxigenase (129-Alox5^{-/-}). * $p < 0,05$ comparado à produção basal dos genes-alvo em dentes sem lesão periapical (linha tracejada) e # $p < 0,05$ comparado aos animais 129 (*wild type*).

Figura 2.7. Expressão do RNAm para interleucinas IL-1α (A), IL-1β (B), IL-10 (C), IL-13 (D) e IL-20 (E) e receptores para interleucina IL1R1 (F) e IL1R2 (G), avaliada aos 7, 14, 21 e 28 dias após contaminação dos canais radiculares de molares de camundongos 129 (wild type) e *knockout* para a enzima 5-lipoxigenase (129-Alox5^{-/-}). * $p < 0,05$ comparado à produção basal dos genes-alvo em dentes sem lesão periapical (linha tracejada) e # $p < 0,05$ comparado aos animais 129 (wild type).

Figura 2.8. Expressão do RNAm para INF- γ (A), MIF (B), CRP (C) e TOLLIP (D), avaliada aos 7, 14, 21 e 28 dias após contaminação dos canais radiculares de molares de camundongos 129 (*wild type*) e *knockout* para a enzima 5-lipoxigenase (129-Alox5^{-/-}). * $p < 0,05$ comparado à produção basal dos genes-alvo em dentes sem lesão periapical (linha tracejada) e # $p < 0,05$ comparado aos animais 129 (*wild type*).

A via 5-LO regula negativamente a expressão de mediadores da osteoclastogênese

Com o objetivo de estudar o papel da via 5-LO na osteoclastogênese e reabsorção óssea induzida pela inflamação periapical, foram investigados (i) a produção de mediadores osteoclastogênicos (RANK, RANKL e OPG) após a contaminação dos canais radiculares pela exposição à cavidade bucal, (ii) a presença de osteoclastos ativos na lesão e (iii) o tamanho da lesão periapical, em animais deficientes para a enzima 5-LO (129-Alox5^{-/-}) e selvagens (129).

A expressão do RNAm para RANK (*Tnfrsr11a*), RANKL (*Tnfsf11*) e OPG (*Tnfsf11b*) para os animais selvagens (129) foi aumentada aos 7 e 14 dias, durante o desenvolvimento da lesão periapical. Interessantemente, a expressão do RNAm para RANKL, mediador da formação de osteoclastos e da reabsorção óssea, observado nos animais 129-Alox5^{-/-}, foi mais intensa do que nos selvagens, aos 7 e 21 dias da exposição dos canais radiculares ($p < 0,05$). A expressão gênica de OPG, por sua vez, não foi aumentada em animais 129-Alox5^{-/-}, comparado aos

animais selvagens, em nenhum período analisado ($p > 0,05$). Tendo em vista que a OPG age como um competidor inibitório, bloqueando a interação RANK-RANKL, inibindo assim a diferenciação osteoclástica, comparamos a razão entre a expressão gênica de RANK e OPG. Essa comparação permitiu evidenciar que a sinalização osteoclastogênica nos animais selvagens é pró-reabsortiva aos 7 e 28 dias da contaminação dos canais radiculares ($p < 0,05$) e nos animais deficientes da enzima 5-LO é pró-reabsortiva aos 7 e 21 dias. Interessantemente, essa razão é maior nos animais deficientes de 5-LO aos 7 e 21 dias ($p < 0,05$), porém aos 28 dias é menor ($p < 0,05$) do que nos animais selvagens (Figura 2.9).

Figura 2.9. Expressão do RNAm para RANK (*Tnfrsf11a*) (A), RANKL (*Tnfsf11*) (B), OPG (*Tnfsf11b*) (C) e razão RANKL/OPG (D), avaliada aos 7, 14, 21 e 28 dias após contaminação dos canais radiculares de molares de camundongos 129 (wild type) e *knockout* para a enzima 5-lipoxigenase (129-Alox5^{-/-}). * $p < 0,05$ comparado à produção basal dos genes-alvo em dentes sem lesão periapical (linha tracejada) e # $p < 0,05$ comparado aos animais 129 (wild type).

A contaminação dos canais radiculares induziu a formação de osteoclastos e o expansão da lesão periapical tanto em animais deficientes de 5-LO como nos selvagens

A contaminação dos canais radiculares levou ao desenvolvimento da lesão periapical nos animais selvagens (129) e deficientes para a enzima 5-lipoxigenase (129-Alox5^{-/-}), sem diferença entre elas do ponto de vista histopatológico. Essa lesão foi caracterizada inicialmente, nos períodos de 7 e 14 dias (Figura 2.10) pelo espessamento do ligamento periodontal apical e recrutamento de neutrófilos e macrófagos e, culminando aos 21 e 28 dias em intensa infiltração de células inflamatórias, perda de continuidade dos tecidos e reabsorção óssea periapical (Figura 2.11).

A histometria das lesões periapicais revelou um aumento do espaço periapical devido à reabsorção óssea nos dentes submetidos à contaminação bucal aos 14, 21 e 28 dias após a exposição dos canais radiculares, diferentemente dos dentes hígidos com ligamento periodontal e osso alveolar íntegros ($p < 0,05$), porém sem diferença na cinética de desenvolvimento quando foram comparados os animais deficientes da enzima 5-LO com os animais selvagens ($p > 0,05$; Figura 2.12A).

Nas lâminas que foram marcadas com TRAP (Figura 2.11), para evidenciar a presença e atividade de osteoclastos, foi observado que os animais 129-Alox5^{-/-} apresentaram uma maior formação de osteoclastos do que os animais selvagens, aos 21 e 28 dias de desenvolvimento da lesão periapical ($p < 0,05$; Figura 2.12B).

Em conjunto, esses resultados mostram que, nos animais deficientes de 5-LO, a maior produção do mediador osteoclastogênico RANKL, ainda que em períodos precoces do desenvolvimento da lesão, leva a maior osteoclastogênese na região periapical aos 21 e 28 dias, quando a reabsorção óssea está evidente. Entretanto, o tamanho da lesão periapical não foi maior nos animais 129-Alox5^{-/-} comparado aos selvagens, independentemente do maior número de osteoclastos e da sinalização pró-reabsortiva mais intensa.

Figura 2.10. Fotomicrografias representativas da região periapical de molares de camundongos selvagens (129; **A, D, G**) e deficientes para a enzima 5-LO (129-Alox5^{-/-}; **B, C, E, F, H, I**) hígidos (**A, B, C**) e após contaminação dos canais radiculares por micro-organismos da cavidade bucal, aos 7 (**D, E, F**) e 14 (**G, H, I**) dias da exposição. HE, aumento original 5× (**H**), 10× (**A, B, D, E, G**) e 40× (**C, F, I**).

Figura 2.11. Fotomicrografias representativas da região periapical de molares de camundongos selvagens (129; **A, D**) e deficientes para a enzima 5-LO (129-Alox5^{-/-}; **B, C, E, F**), após contaminação dos canais radiculares por micro-organismos da cavidade bucal, aos 21 (**A, B, C**) e 28 (**D, E, F**) dias da exposição. No quadro inferior, histoenzimologia para a enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) na região periapical de camundongos selvagens (129; **G, I**) e deficientes para a enzima 5-LO (129-Alox5^{-/-}; **H, J**), aos 21 (**G, H**) e 28 (**I, J**) dias da exposição. HE, aumento original 10× (**A, B, D, E**) e 40× (**C, F**). TRAP, aumento original 40× (**G, H, I, J**).

Figura 2.12. Histometria da lesão periapical experimental, por meio da mensuração da área da lesão ou do ligamento periodontal apical em μm^2 (A) e contagem no número de osteoclastos positivos para a enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP⁺) em toda extensão da lesão (B). As mensurações foram realizadas aos 7, 14, 21 e 28 dias após contaminação dos canais radiculares de molares de camundongos 129 (wild type) e knockout para a enzima 5-lipoxigenase (129-Alox5^{-/-}). * $p < 0,05$ comparado à medida do ligamento periodontal de dentes hígidos (linha tracejada) ou ao número de osteoclastos TRAP⁺ em dentes sem lesão periapical (linha tracejada) e # $p < 0,05$ comparado aos animais 129 (wild type).

DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que a enzima 5-lipoxigenase apresenta um papel importante na síntese de mediadores inflamatórios e osteoclastogênicos durante a invasão microbiana dos canais radiculares e desenvolvimento da lesão periapical experimental. Interessantemente, esse papel desempenhado pela 5-LO na osteoclastogênese *in vivo* foi protetor, tanto na sinalização quanto na formação de osteoclastos TRAP⁺. Todavia, essa modulação osteoclastogênica não foi suficiente para controlar o catabolismo ósseo periapical.

Os mecanismos envolvidos na formação de osteoclastos induzido por RANKL via 5-LO também foram demonstrados previamente (Hikiji *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2012). O receptor BLT1, mas não o receptor BLT2, apresenta um papel fundamental na atividade osteoclástica durante a perda óssea causada pela ovariectomia ou pela injeção intraperitoneal de LPS (Hikiji *et al.*, 2009) e desde então tem sido proposto como um potencial alvo terapêutico para o tratamento das patologias ósseas. Nossos resultados, por outro lado, mostraram que na ausência da enzima 5-LO a sinalização osteoclastogênica é exacerbada, porém a doença evolui

de modo semelhante àquela observada em animais selvagens. Com relação aos possíveis receptores envolvidos no processo, houve inibição da expressão de *Ltb4r1*, que codifica o receptor BLT1, em todos os períodos avaliados e inibição de *Ltb4r2*, que codifica o receptor BLT2 aos 14 dias, sem modulação nos demais períodos. Por outro lado, houve maior síntese do RNAm para o receptor nuclear PPAR δ . Esses dados, em conjunto, indicam que a sinalização por receptores de superfície, que acontece quando o LTB₄ é secretado no meio extracelular e atua de modo autócrino ou parácrino no microambiente periapical pode ser distinta da sinalização por receptores nucleares quando o LTB₄, convertido a partir da ação da enzima LTB₄ hidrolase sobre o LTA₄ é mantido no interior da célula. Essa sinalização intra ou extracelular poderia definir o curso da osteoclastogênese apical. Outros leucotrienos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄) também podem participar deste processo, uma vez que compartilham a mesma via de síntese do LTB₄, porém não foram investigados no presente estudo.

A presença e localização intracelular da enzima 5-LO foi demonstrada previamente por meio de imunoistoquímica em fibroblastos, osteoclastos e células endoteliais durante a formação de calo ósseo após a fratura de osses longos em camundongos (Lin e O'Connor, 2014). O tratamento com inibidores farmacológicos da via 5-LO acelerou o reparo das fraturas femurais, caracterizado por uma regeneração óssea melhorada (Cottrell e O'Connor, 2009; Wixted *et al.*, 2009). Estes resultados foram explicados pelo fato de que tanto o LTB₄ endógeno como aquele adicionado de fonte exógena inibem a proliferação de osteoblastos (Ren e Dziak, 2001) e a formação de tecido mineralizado *in vitro* (Traianedes *et al.*, 1998), estimulam os osteoclastos a reabsorverem matrizes calcificadas *in vitro* (Gallwitz *et al.*, 1993; Jiang *et al.*, 2005) e em calvária de murinos *in vivo* (Garcia *et al.*, 1996). Recentemente foi demonstrado que a movimentação dentária induzida em animais na ausência da enzima 5-lipoxigenase resulta em menor reabsorção óssea, recrutamento e formação de osteoclastos TRAP⁺ e expressão de *Tnfa*, *Il10* e *Runx2*. O tratamento com LTB₄ e LTD₄, na presença de RANKL, induziram *in vitro* a diferenciação de osteoclastos e a produção de TNF- α (Moura *et al.*, 2014). Estes resultados também são divergentes dos nossos, pois observamos que a via 5-LO desempenha um papel protetor na formação de osteoclastos *in vivo*, ainda que isto não resulte em menor perda óssea. Considerando que esses resultados divergentes foram observados em modelos de reabsorção óssea distintos, ou seja, aplicação de força, fratura mecânica, injeção intraperitoneal de LPS, ovariectomia ou contaminação microbiana dos canais radiculares, a manipulação desta via visando o controle do catabolismo ósseo em

condições fisiológicas ou patológicas merece futuras investigações. Paralelamente, deve-se considerar também que animais deficientes de 5-LO apresentam, como característica fenotípica, um tecido ósseo com maior densidade mineral (Mehrabian *et al.*, 2005; Anexo C) e a destruição óssea nestes animais pode apresentar uma cinética diferenciada com relação aos animais selvagens, não só pelas diferentes moléculas envolvidas na regulação da reabsorção óssea como também pela microdureza do tecido. De fato, quando utilizamos o inibidor bioquímico da via 5-LO (MK-886) para bloquear a síntese de mediadores desta via durante o desenvolvimento da lesão periapical, observamos que aos 21 e 28 dias os animais que receberam o medicamento apresentaram lesões periapical mais extensas do que os animais não tratados (Paula-Silva *et al.*, 2016).

Especificamente com relação à sinalização osteoclastogênica, lesões periapicais induzidas em ratos, após exposição dos primeiros molares inferiores ao meio bucal, por 7 a 28 dias, foram caracterizadas por um grande número de osteoclastos e células positivas para a proteína RANKL aos 7 dias, atingindo o pico aos 14 dias. Aos 21 e 28 dias, houve uma redução número de células positivas para RANKL (Zhang e Peng, 2005). A expressão do RNAm para RANK, RANKL e OPG também foi investigada por RT-PCR, em lesões periapicais de ratos, induzidas pela contaminação dos canais radiculares pelo ambiente bucal após 1 a 8 semanas da exposição (Kawashima *et al.*, 2007). Duas semanas após a indução da lesão periapical foi observada indução da expressão de RANKL, com pico na terceira semana. A cinética da expressão de OPG foi semelhante a de RANKL, ocorrendo um aumento da razão entre RANKL / OPG na segunda e terceira semanas.

Quando há um desequilíbrio na expressão de RANKL e OPG causado por uma maior quantidade de RANKL, o resultado usualmente é uma atividade osteoclástica aumentada seguida pela reabsorção óssea (Menezes *et al.*, 2006; Baud'huin *et al.*, 2007; Menezes *et al.*, 2008). Entretanto, a expressão aumentada de RANKL nem sempre leva ao catabolismo ósseo, pois a presença do receptor solúvel OPG pode contrabalancear o processo de reabsorção (Boyle *et al.*, 2003; Anandarajah, 2009). A lesão periapical se desenvolve e progride para perda óssea apical, quando há um aumento da atividade de RANKL associado à diminuição da atividade regulatória da OPG (Menezes *et al.*, 2006; Menezes *et al.*, 2008).

Outro achado importante deste estudo foi a observação que, na ausência de 5-LO, há menor produção de mediadores inflamatórios (*Il13*, *Il20*, *Crp*, *Cxcl5*, *Cxcl10*, *Cxcl13*, *Cxcl15*, *Cx3cl1*, *Ccl1*, *Ccl4*, *Ccl8*, *Ccl12*, *Ccl17*, *Ccl18*, *Ccl20*, *Ccl25*, *Tollip* e *Mif*) e receptores (*Ccr5*, *Ccr8*

e *Cxcr5*) na região periapical, porém há mais osteoclastogênese nos períodos de 21 e 28 dias após a contaminação dos canais radiculares. Isso indica que a via 5-LO é pró-inflamatória, porém apresenta um papel protetor na sinalização e atividade osteoclastogênica *in vivo*.

Em lesão periapical de ratos, foi observado que a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF- α aumenta concomitantemente à expressão de RANKL, sugerindo um efeito sinérgico do RANKL e das citocinas pró-inflamatórias para a progressão das lesões periapicais (Kawashima *et al.*, 2007). No millieu periapical, a síntese de OPG e IL-10, reguladores negativos de RANKL são rapidamente induzidas como provável mecanismo de defesa do hospedeiro para evitar a perda óssea exacerbada (Kawashima *et al.*, 2007). No presente estudo foi observada essa correlação positiva entre a síntese do RNAm para IL-10 e para RANKL, nos animais selvagens e, interessante, aumentada nos animais deficientes de 5-LO, principalmente aos 7 e 21 após contaminação dos canais radiculares. A IL-10 pode ser, portanto, um mediador chave no controle da reabsorção periapical, pois mesmo apresentando um maior número de osteoclastos, a extensão da lesão nos animais deficientes de 5-LO não foi maior do que nos selvagens. Estas interpretações são respaldadas pelos estudos prévios que demonstraram que a IL-10 é um importante supressor endógeno da reabsorção óssea periapical *in vivo* induzida pela contaminação dos canais radiculares (Sasaki *et al.*, 2000; De Rossi *et al.*, 2008). Outras interleucinas como IL-1 α e IL-1 β e os receptores para IL1 do tipo 1 e 2 tiveram seu RNAm aumentado nos animais deficientes de 5-LO durante o desenvolvimento da lesão periapical corroborando com achados prévios que mostram que estas citocinas são importantes reguladoras da osteoclastogênese e do metabolismo ósseo (Nakashima e Takayanagi, 2008; Lee *et al.*, 2014).

As quimiocinas são também importantes reguladores do metabolismo do tecido ósseo, tanto em situações fisiológicas como nas doenças. Estes mediadores podem atuar independentemente de RANKL, visando recrutar e direcionar precursors de osteoblastos e osteoclastos para sítios específicos (Bendre *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2007). De modo semelhante às interleucinas, a quimiocina *Ccl3*, importante para a quimiotaxia de precursors de osteoclastos e para a diferenciação mediada pelo fator solúvel RANKL (Yu *et al.*, 2004) e a quimiocina *Cxcl9*, que promove a adesão, migração e diferenciação de osteoclastos sob a influência de citocinas (Kwak *et al.*, 2005), também foram aumentadas em animais deficientes de 5-LO, principalmente em períodos iniciais de recrutamento de células inflamatórias e do sistema imune, o que pode ter resultado em maior formação de

osteoclastos em períodos tardios.

O receptor CCR1, expresso na superfície de precursors de osteoclastos, liga-se às quimiocinas CCL3, CCL5, CCL7, CCL9 e CCL23, estimulando o direcionamento das células para sítios específicos para que ocorra a fusão e reabsorção óssea (Yu *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006). Embora a expressão gênica de *Ccr1* tenha sido pouco modulada tanto em animais deficientes para a enzima 5-LO como em animais selvagens (Apêndice), a expressão do RNAm para *Ccl3*, *Ccl5* e *Ccl9* foi bastante aumentada nos animais deficientes de 5-LO.

Outro resultado interessante foi a correlação entre a baixa expressão do RNAm para *Infg* (INF- γ) e para a quimiocina CXCL10 nos animais deficientes de 5-LO e o maior número de osteoclastos detectados por histoenzimologia (TRAP⁺). Durante a resposta imuno-inflamatória, o receptor CXCR3 e seu ligante CXCL10 levam ao recrutamento de células Th1, as quais produzem *Infg* (INF- γ) e ativam macrófagos pela via clássica para desempenhar sua função (Kabashima *et al.*, 2002; Garlet *et al.*, 2003). Todavia, INF- γ é um inibidor da osteoclastogênese (Nakashima e Takayanagi, 2008). Assim, a modulação negativa do eixo CXCL10- INF- γ nos animais deficientes de 5-LO pode ter contribuído para o maior número de osteoclastos TRAP⁺ na região periapical.

Frente a estes resultados, acreditamos que a íntima relação entre a inflamação periapical, a sinalização osteoclastogênica, a atividade de osteoclastos e perda óssea deverá ser investigada mais profundamente. Essa necessidade de estudo se dá em função de é amplamente aceito que a osteoclastogênese e a perda óssea são reguladas pelo balanço na expressão de RANKL e OPG, a via canônica da osteoclastogênese. Porém, no presente estudo, foi evidenciada a sinalização e osteoclastogênese mais intensas nos animais deficientes da enzima 5-lipoxigenase, não acompanhado de perda óssea de maior extensão. O LTB₄, um dos produtos de metabolismo da via 5-LO, apresenta como principal função o recrutamento das células inflamatórias frente ao agente agressor. Porém, esses efeitos podem ser mediados de forma direta ou por meio da indução da secreção de outras moléculas no sítio inflamatório para que o hospedeiro consiga executar uma boa resposta de defesa contra patógenos (Le Bel *et al.*, 2014). Assim, podem existir outros mecanismos de regulação cruzados que devem ser finamente orquestrados para o balanço da resposta imune. Em estágios iniciais da lesão os leucotrienos atuam no recrutamento de células mononucleares e formação de osteoclastos e em estágios tardios atuam como fator de proteção à perda óssea. Esta é uma hipótese a ser testada e que merece futuras investigações

CAPÍTULO 3

PAPEL DO LEUCOTRIENO B₄, UM DOS PRODUTOS DA VIA 5-LIPOXIGENASE, NA DIFERENCIAÇÃO E ATIVAÇÃO DE OSTEOCLASTOS A PARTIR DE CÉLULAS PRECURSORAS

A reabsorção óssea resultante da inflamação periapical é um processo que envolve uma série de etapas, iniciando com a proliferação de precursores de osteoclastos advindos de monócitos da linhagem hematopoiética, seguido pela diferenciação e maturação celular, resultando finalmente na destruição óssea (Tay *et al.*, 2004; Gallagher, 2008; Paula-Silva *et al.*, 2010; Trouvin e Goeb, 2010; Boyce, 2013).

Diversas citocinas e fatores de crescimento são essenciais para diferenciação e maturação dos osteoclastos. Dentre esses, as interleucinas (IL-1 α , IL-6, IL-11, IL-15, IL-17 e IL-18), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), fator estimulador de formação de colônia de monócitos (M-CSF, CSF2 e CSF3), prostaglandinas e leucotrienos (Garlet *et al.*, 2006; Fracon *et al.*, 2008; Blackwell *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012; McCoy *et al.*, 2013; Lin e O'Connor, 2014). Esses fatores atuam pela estimulação das células progenitoras de osteoclastos ou na regulação de um sistema parácrino que inclui as moléculas RANK (Receptor ativador do fator nuclear kappa B), ligante para RANK (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) (Hofbauer e Heufelder, 2001; Zhao *et al.*, 2007; Boyle *et al.*, 2003; Boyce, 2013).

O processo canônico da osteoclastogênese é regulado pelos mediadores solúveis RANKL e OPG. Suscintamente, RANK é um receptor expresso na superfície dos osteoclastos e seus progenitores, células dendríticas e células T ativadas (Boyle *et al.*, 2003; Wang e McCauley, 2011; Boyce, 2013). RANKL é um mediador solúvel sintetizado por osteoblastos, células da medula óssea e células endoteliais, que induz a ativação e a fusão dos osteoclastos quando se liga ao receptor RANK. RANKL é um membro da superfamília do fator de necrose tumoral, sendo considerada a mais importante citocina envolvida em vários estágios da reabsorção óssea (Sabeti *et al.*, 2005; Leibbrandt e Penninger, 2008). RANKL é necessário para induzir a expressão de genes da linhagem osteoclástica, incluindo a fosfatase ácida resistente ao tartarato (*Acp5*), catepsina K (*Ctsk*), metaloproteinase da matriz-9 (*Mmp9*) e o receptor para calcitonina (*Ccrp*), conduzindo assim à maturação destas células (Boyle *et al.*, 2003; Lau *et al.*, 2005; Boyce, 2013). Os efeitos do RANKL são bloqueados por receptores solúveis, como

a osteoprotegerina, secretada por osteoblastos, que ao se ligar a RANKL, impede sua ligação ao receptor RANK, inibindo a diferenciação de osteoclastos (Jin *et al.*, 2007; Raggatt e Partridge, 2007; Belibasakis *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2014). A superexpressão de OPG bloqueia a maturação dos osteoclastos, levando ao desenvolvimento de osteopetrose em ratos, bem como a deleção do gene para OPG resulta no aumento da reabsorção óssea, induzindo o desenvolvimento de osteoporose (Kearns *et al.*, 2008; Anandarajah, 2009).

Em estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa, demonstramos que o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) ou a contaminação dos canais radiculares foi capaz de induzir inflamação periapical e a expressão do gene *Alox5*, responsável pela codificação da enzima 5-LO, concomitantemente à expressão dos genes *Tnfrsf11a*, *Tnfsf11* e *Tnfrsf11b*, que codificam os mediadores da osteoclastogênese RANK, RANKL e OPG, respectivamente (Santos *et al.*, 2015; Paula-Silva *et al.*, 2016). A sinalização entre células do sistema imune, células da linhagem hematopoiética e células residentes do tecido pode resultar na degradação das matrizes orgânicas colagênicas e inorgânicas do tecido ósseo, dependendo da natureza dos mediadores envolvidos no processo (Tay *et al.*, 2004; Gallagher, 2008; Paula-Silva *et al.*, 2010; Trouvin e Goeb, 2010; Boyce, 2013).

A ação de mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico em eventos inflamatórios é amplamente estudada. No entanto, a atuação destes mediadores em populações celulares precursoras de osteoclastos presentes no sítio da inflamação são pouco conhecidos. Portanto, o objetivo específico deste estudo foi investigar o papel do leucotrieno B₄ na diferenciação de células da linhagem monocítica de camundongos (J774A.1) em osteoclastos, após estimulação com Leucotrieno B₄ encapsulado sob a forma de microesferas. Essa estratégia terapêutica, baseada no uso de microesferas de ácido polilático-co-glicólico (PLGA), visa promover um *delivery* sustentado de mediador lipídico ao longo do tempo uma vez que os mediadores lipídicos são extremamente lábeis (Nicolette *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2011).

METODOLOGIA

Preparo das microesferas

Para obtenção das microesferas foi utilizado o método de simples emulsão óleo-água seguido do processo de evaporação do solvente (Nicolette *et al.*, 2007; Nicolette *et al.*, 2008).

Brevemente, o LTB₄ obtido da Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, EUA) foi dissolvido em solução estoque de etanol absoluto (100 µg/mL). 0,3 mL da fase orgânica, o equivalente a 3×10^{-5} M da solução de LTB₄ foi adicionado a 10 mL de diclorometano contendo 30 mg de ácido poliláctico-co-glicólico 50:50 (PLGA) (Boehringer Ingelheim, Alemanha). A seguir foram adicionados 40 mL de álcool polivinílico a 3% (PVA a 3% peso/volume) (Sigma-Aldrich CO., St. Louis, MO, EUA) e a solução agitada mecanicamente por 4 horas a 600 rpm (RW-20; Ika® Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Alemanha). As microesferas foram lavadas por três vezes com água deionizada (Milli-Q®, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha), liofilizadas e mantidas em freezer a -20° C até o uso.

Teste de Esterilidade

Para avaliação de contaminação bacteriana das microesferas preparadas foi realizado o teste de esterilidade. Para tanto, placas de Petri contendo o meio BHI (*Brain Heart Infusion*; Sigma-Aldrich) foram preparadas com ágar, como segue: 3,7 g de BHI, 1,5 g de Ágar e 95 mL de água destilada. O ágar foi autoclavado a 120° C, por um período 15 minutos, e cerca de 8 mL foram dispensados em placas de Petri em fluxo laminar. Após geleificação, as placas com ágar foram mantidas em estufa úmida a 37° C por um período de 24 horas. Após este período, as placas foram envolvidas em filme plástico e estocadas em geladeira até uso.

A seguir, uma pequena quantidade das microesferas preparadas foi colocada em 500 µL de solução salina fosfatada tamponada 1× (PBS) e, após solubilização, 100 µL da solução foram dispensados sobre a placa de Petri contendo ágar e espalhados por toda a superfície. As placas foram mantidas em estufa úmida a 37° C por um período de 24 horas para detectar o crescimento bacteriano, se presente.

Detecção de endotoxina

Em fluxo laminar, 1 mg de cada lote das microesferas preparadas e liofilizadas foi transferido com auxílio de espátula muflada para microtubos de 1,5 mL esterilizados. As amostras foram diluídas na proporção 1:1 em água apirogênica, de modo a obter uma concentração de 1 µg / mL. Para quantificação de endotoxina foi utilizado o kit Limulus Amebocyte Lysate (LAL) QCL-1000™ (Lonza Walkersville, Inc., Olten, Suíça), conforme instruções do fabricante, utilizando o método de microplacas. Para obtenção da curva-padrão, foi adotado o regime de diluição seriada, a partir de 1,0 UE / mL endotoxina de *E. coli* 0111:B4

(E50-640).

A microplaca onde foram realizados os testes foi previamente aquecida até atingir a temperatura de 37° C ($\pm 1^\circ$ C) e, sequencialmente, 50 μ l das amostras foram pipetadas, sendo realizadas duplicatas de cada amostra analisada. A seguir, 50 μ l de LAL foram adicionados por poço e a microplaca incubada a 37° C, por 10 minutos. Neste momento, 100 μ l das soluções contendo os substratos previamente aquecidos foram pipetados e a microplaca novamente mantida a 37° C, por 6 minutos. Foram adicionados 100 μ l do reagente de parada da reação em cada poço e a densidade óptica foi analisada num comprimento de onda de 405 nm em espectrofotômetro μ Quant™ (BioTek® Instruments Inc., Winooski, EUA), utilizando o software KC4™ Data Analysis Software (BioTek® Instruments Inc.), para determinar a concentração de unidades de endotoxina em cada mL de solução contendo microesferas (EU / mL).

Caracterização das microesferas

Análise de tamanho, potencial zeta e morfologia

A análise do tamanho foi avaliada pela mensuração do diâmetro das microesferas com o uso de um analisador de tamanho de partícula (LS 13 320 Laser Diffraction Particle Size Analyzer; Beckman Coulter, EUA). As microesferas liofilizadas foram dispersas em água deionizada e submetidas à análise. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão do tamanho (diâmetro) das partículas.

O potencial zeta foi analisado através do equipamento Nano Zeta Sizer (Malvern Instruments, Inglaterra). Para esta análise, as microesferas liofilizadas também foram dispersas em água deionizada. O polímero PLGA (50:50), constituído de ésteres derivados de ácidos láctico e glicólico, possui residual de carga elétrica negativa. Desta forma, a análise de potencial zeta das microesferas foi realizada a fim de verificar se a encapsulação alterou o residual de carga elétrica.

A forma e a superfície das microesferas liofilizadas foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (ZEISS, Evo 50, Cambridge, Inglaterra). As microesferas foram dispostas sobre porta-amostras (*stubs*) contendo uma fita adesiva isolante, e adicionada uma fina camada de ouro em pó. Após o recobrimento por 90 segundos foram submetidas corrente elétrica de 40 mA e, posteriormente, à análise microscópica em alto vácuo (1×10^{-5} Torr) e com uma tensão de 5-20kV.

Eficiência de encapsulação do LTB₄ em microesferas

A taxa de encapsulação do LTB₄ foi realizada através da dissolução do polímero (4 mg de microesferas) com 1 mL do solvente orgânico acetonitrila (J.T.Baker. Solusorb®, EUA), seguida da agitação em vórtex por 30s, e posterior filtragem e secagem por evaporação do solvente através de um concentrador de amostras (Speed vacuum, Eppendorf, Alemanha). As amostras secas foram ressuspensas em 0,5 mL do tampão EIA (Cayman). Foram realizadas as quantificações do LTB₄ liberados das microesferas por ensaio imuno-enzimático de competição, de acordo com instruções do fabricante (EIA, Amershan Biosciences, Piscataway, NJ, EUA).

Estudo em cultura de macrófagos J774A.1

Foi utilizada a linhagem de macrófagos J774A.1 de camundongos, previamente obtida da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC®, Anexo E), mantida em nitrogênio líquido (criopreservação) em solução de congelamento composta por meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, NY, EUA), suplementado com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 90% de soro fetal bovino (SBF; Gibco).

As células foram descongeladas à temperatura ambiente e expandidas em frascos de cultura celular de 150 cm² (Corning Glass Workers, NY, EUA) em meio DMEM suplementado com 10% de FBS, à temperatura de 37° C, em incubadora umidificada contendo 5% de CO₂.

Tratamento com agentes imunoestimuladores e farmacológicos

Para diferenciação celular de osteoclastos, a presença do mediador solúvel RANKL é de fundamental importância assim como a presença do fator estimulador de formação de colônia de monócitos (M-CSF / CSF-1).

As células foram cultivadas na presença de M-CSF (30 ng / mL; R&D Systems, Minneapolis, EUA), e com RANKL (10 ng / mL; R&D Systems), para proliferação de macrófagos e estimular a formação de osteoclastos. Para confirmar o fenótipo osteoclástico, as células foram fixadas e marcadas para TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato). A expressão de genes que indicam um fenótipo de osteoclastos foi realizada por RT-PCR em tempo real.

A seguir, as células foram plaqueadas na densidade de 1×10^5 células por poço em placas de cultura de 96 poços e estimuladas com LTB₄ encapsulado em microesferas nas

concentrações de 0,01 μM e 0,1 μM , por 12, 24, 48 e 72 horas. Para experimentação foi utilizado o meio DMEM sem SFB e as placas foram mantidas em incubadora a 37° C e 5% CO_2 .

Ensaio de citotoxicidade pelo método lactato desidrogenase (LDH)

Para avaliação da citotoxicidade, as células foram plaqueadas em meio livre de soro, na concentração de 1×10^5 células por poço, em placas de 96 poços e mantidas em incubadora a 37°C e 5% CO_2 por 12 horas (*overnight*). Após este período, as culturas foram estimuladas com diferentes concentrações dos agentes farmacológicos e imunoestimuladores, por 24 horas. A seguir, 50 μL do sobrenadante foi coletado e transferido para uma nova placa de 96 poços com fundo transparente e plano e adicionado 50 μL do *CytoTox 96® Reagent* para cada amostra. A placa foi então coberta com uma folha de papel alumínio para proteger contra a luz e as amostras incubadas a 25° C por 30 minutos. Decorrido este período, 50 μL da solução de bloqueio (*Stop Solution*) foram adicionados em cada poço. A absorbância foi determinada imediatamente em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 490 nm ($\mu\text{QuantTM}$, BioTek® Instruments Inc.). Os grupos foram comparados entre si por meio do teste ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$).

Determinação da formação de osteoclastos por meio de enzimologia para atividade da enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP)

A formação dos osteoclastos foi determinada pela atividade da enzima TRAP. As células foram incubadas em solução contendo 8 mg de naftol AS-MX sal fosfato di-sódico (Sigma-Aldrich) em 500 μL de N-N-dimetilformamida, seguido pela adição de 50 mL de uma solução-tampão de 0,2 mol / L de acetato de sódio (pH 5,0), contendo 70 mg de Fast Red ITR (Sigma-Aldrich). A seguir o substrato tartarato de sódio diidratado (50 mmol / L) foi adicionado à solução e incubado a 37° C por 2 horas. Posteriormente, os poços foram lavados em água destilada e as células coradas por hematoxilina de Harris. Como controle, células foram incubadas com meio sem o substrato. A análise da formação de osteoclastos positivos para a enzima TRAP foi determinada com base na presença ou ausência de marcação, em dois experimentos independentes. Primeiramente, as placas foram fotografadas em microscopia de campo claro, em aumento de 10 $\times$. Para quantificação das células multinucleadas TRAP⁺ por campo de visão, foi utilizado o Software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) e o *plugin* para deconvolução de imagens (*Colour Deconvolution*). Primeiramente foi

aplicado o vetor Fast Red e, a seguir, o canal vermelho selecionado e o *threshold* ajustado manualmente. Para contagem do número de células foi utilizada a ferramenta *Analyze Particles*, após calibração para que a contagem englobasse apenas estruturas com o tamanho de pixels mínimo de 500, o que equivale ao tamanho de uma célula multinucleada com pelo menos 3 núcleos. Os grupos foram comparados entre si por meio do teste ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

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

O RNA total foi obtido por extração à base de tiocianato de guanidina, pelo método de colunas (RNeasy® Mini, Qiagen Inc., Valencia, EUA). A pureza e a estimativa da quantidade de ácidos nucleicos foi realizada utilizando a espectrofotometria em NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA). O cDNA foi sintetizado por meio de uma reação de transcrição reversa, a partir de 1 µg de RNA total. As amostras foram incubadas a 25° C por 10 minutos para ligação do *primer* ao RNA, seguido por incubação a 37° C por 2 horas para transcrição reversa, utilizando a enzima transcriptase reversa, e posterior incubação a 85° C por 5 segundos para inativação da enzima (High Quality cDNA Reverse Transcriptase Kits, Applied Biosystems, Foster City, EUA).

Para as reações de qRT-PCR, alíquotas de 2 µl (50 ng) de cDNA foram adicionadas a 10,0 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2×, 1,0 µL de TaqMan Gene Expression Assay 20× (par de *primers* + sonda) e acrescido de água livre de RNase para um volume final de 20 µL / poço. *Primers* e sondas para *Alox5* (Mm01182747), *Alox5ap* (Mm00802100), *Acp5* (Mm00475698), *Mmp9* (Mm00442991), *Ctsk* (Mm00484039) e *Crcp* (Mm01197736) foram obtidos comercialmente e são propriedades privadas, portanto as sequências não estão disponíveis (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems). Os genes para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*) e para beta-actina (*Actb*) foram utilizados como referência. Como controle negativo foi utilizada água destilada deionizada, submetida à reação com cada par das sequências dos *primers* e sondas utilizados.

A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: ativação da polimerase AmpliTaq Gold Enzyme a 95°C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 2 segundos para desnaturação do DNA e 60°C por 20 segundos para anelamento do *primer* e polimerização utilizando o equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems) e o *Software* Step One versão 2.2.3 (Applied Biosystems).

Os resultados foram analisados com base no valor do ciclo limiar (*Ct*, *cycle threshold*).

Para normalizar os valores de Ct, o Ct determinado para uma amostra foi subtraído do Ct da média geométrica dos genes de referência (*Gapdh* e *Actb*) da mesma amostra, gerando assim o ΔCt . Para cada gene, o cálculo de expressão relativa foi realizado a partir da diferença entre o ΔCt das amostras e o ΔCt apresentado pelo controle ($\Delta\Delta Ct$), com base na equação: *Expressão relativa* = $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os grupos foram comparados entre si por meio do teste ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey ou pelo pós-teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$).

RESULTADOS

A via 5-LO está envolvida na diferenciação osteoclástica de células da linhagem hematopoiética

Durante a diferenciação de osteoclastos induzida por M-CSF e RANKL há expressão gênica de 5-lipoxigenase (*Alox5*), induzida 48 horas após a adição do estímulo ($p < 0,05$), assim como da expressão da proteína ativadora de 5-lipoxigenase (*Alox5ap*), induzida 48 e 72 horas após ($p < 0,05$) (Figura 3.1). Estes resultados indicam que a via 5-LO e os metabólitos produzidos durante o metabolismo do ácido araquidônico podem estar envolvidos no processo de diferenciação de osteoclastos.

Figura 3.1. Expressão relativa dos genes *Alox5* (A) e *Alox5ap* (B), que codificam a enzima 5-LO e a proteína ativadora de 5-LO (FLAP) respectivamente, 12, 24, 48 e 72 horas após estimulação de macrófagos murinos J774A.1 com M-CSF (30 ng / mL) e RANKL (10 ng / mL). * $p < 0,05$ comparado a células mantidas em meio de cultura sem soro (linha tracejada).

Com a finalidade de investigar se a modulação da osteoclastogênese é positiva ou negativa, foram preparadas microesferas contendo leucotrieno B₄, um dos produtos da via 5-LO, para utilização nos experimentos subsequentes.

Caracterização das microesferas preparadas para delivery sustentado de LTB₄

Não foi constatada presença de contaminação bacteriana em nenhum lote de microesferas preparadas, após cultura em meio BHI-ágar, por um período de 24 horas em estufa. Da mesma maneira, não foi detectada presença de endotoxina nas amostras de cada lote preparado. Portanto, as microesferas vazias ou contendo LTB₄ encapsulado, puderam ser utilizadas nos experimentos subsequentes.

Após a liofilização das microesferas obtidas pelo método de evaporação do solvente, foi realizada a caracterização através da dispersão de seus diâmetros, após a reconstituição em água destilada e deionizada. O diâmetro médio das microesferas vazias foi de $4,1 \pm 2,7 \mu\text{m}$ (Figura 3.2A) e das microesferas contendo LTB₄ (MS-LTB₄) foi de $5,1 \pm 4,5 \mu\text{m}$ (Figura 3.2B). Portanto, as microesferas não tiveram seus diâmetros alterados pelo processo de encapsulação do LTB₄.

Com relação à estabilidade elétrica das microesferas, não houve diferenças relevantes entre as médias do potencial zeta das microesferas vazias ($-21,7\text{mV} \pm 5,5 \text{ mV}$ (Figura 3.2C) e das microesferas contendo LTB₄ (MS-LTB₄) ($-10,7\text{mV} \pm 3,6 \text{ mV}$, Figura 3.2D). Portanto, a encapsulação da LTB₄ proporcionou um bom tamanho e não resultou em alterações de carga elétrica na superfície do PLGA.

Por meio da microscopia eletrônica de varredura foi determinada a forma e a topografia das microesferas obtidas. De modo global, as microesferas vazias ou contendo LTB₄ (MS-LTB₄) apresentaram forma esférica, superfícies uniformes e sem poros (Figura 3.2E-F).

Figura 3.2. Caracterização das microesferas vazias (A, C, E) ou contendo LTB₄ (B, D, F), de acordo com o seu tamanho, potencial zeta e morfologia. Distribuição do diâmetro em µm (A, B), distribuição do potencial zeta em mV (C, D) e topografia em microscopia eletrônica de varredura (E, F).

A adição exógena de LTB₄ incorporado em microesferas inibe a osteoclastogênese

Tendo em vista que observamos uma modulação positiva da via 5-LO durante a osteoclastogênese, investigamos se a adição exógena de LTB₄ poderia modificar o curso da diferenciação celular. Para tanto, foi utilizado LTB₄ em duas concentrações distintas (0,01 µM e 0,1 µM), incorporados em microesferas de ácido lático-co-ácido glicólico (PLGA). Esta estratégia foi empregada pois o experimento de diferenciação de osteoclastos é longo (12 a 72 horas) e a meia-vida dos mediadores lipídicos é curta. Assim, objetivamos manter o LTB₄ disponível por todo o período de manutenção da cultura celular. A eficiência de encapsulação do LTB₄ nas microesferas de PLGA foi de 42%.

As microesferas preparadas não foram citotóxicas para os macrófagos,

independentemente se continham ou não LTB_4 , comparado ao DMSO (controle positivo; $p < 0,05$). A estimulação com M-CSF + RANKL também não foi citotóxica comparado ao meio de cultura DMEM ($p > 0,05$) (Figura 3.3).

Figura 3.3. Efeito citotóxico das diferentes molaridades (0,01 μM e 0,1 μM) do LTB_4 encapsulado em microesferas e de microesferas vazias, bem como dos estímulos M-CSF + RANKL, em cultura de macrófagos murinos J774A.1, mensurado por meio do teste LDH, 24 horas após a exposição. * $p < 0,05$ comparado ao controle positivo (DMSO).

Após 72 horas, o tratamento com M-CSF + RANKL levou a formação de colônias celulares e diferenciação em osteoclastos TRAP+ diferentemente do observado no grupo mantido com meio DMEM sem SFB. Interessantemente, o tratamento com M-CSF + RANKL + microesferas de LTB_4 levou a menor formação osteoclastos sobre a placa de cultura, independentemente da concentração utilizada ($p < 0,05$). O tratamento com M-CSF + RANKL + microesferas vazias apresentou resultado semelhante ao M-CSF + RANKL ($p > 0,05$). Estes resultados mostram que LTB_4 , o metabólito da via 5-LO produzido pela ação da enzima leucotrieno A4 hidrolase sobre o LTA_4 , reduz o potencial osteoclastogênico induzido por M-CSF + RANKL (Figura 3.4)

Figura 3.4. Imagens representativas de macrófagos murinos J774A.1 e osteoclastos diferenciados (TRAP⁺), cultivados em meio DMEM (controle) (A), com M-CSF (30 ng / mL) + RANKL (10 ng / mL) (B), com M-CSF (30 ng / mL) + RANKL (10 ng / mL) contendo microesferas (MS) de LTB₄ nas concentrações de 0,01 μM (C) e 0,1 μM (D), e com M-CSF (30 ng / mL) + RANKL (10 ng / mL) contendo microesferas vazias (MS) (E), 72 horas após adição dos estímulos. Gráfico mostra a quantificação do número de osteoclastos, por campo de visão, no aumento de 5× (F).

LTB₄ induz a expressão de Mmp9 porém inibe Ccrp e Ctsk, sem alterar Acp5

Com o objetivo de investigar o efeito da adição exógena de LTB₄ sobre a síntese de moléculas envolvidas na diferenciação de osteoclastos, foi avaliada a expressão gênica de um painel de marcadores da formação e atividade de clastos.

O gene *Acp5*, que codifica a enzima TRAP não foi modulado pela adição de M-CSF + RANKL com ou sem LTB₄, 48 ou 72 horas após o estímulo ($p > 0,05$). O gene *Mmp9*, que codifica a enzima metaloproteinase da matriz-9, foi estimulado pela adição de M-CSF + RANKL ao meio de cultura, tanto 48 quanto 72 horas após o estímulo ($p < 0,05$). Interessantemente, após 48 horas o LTB₄ não exerceu nenhum efeito na síntese de *Mmp9* ($p > 0,05$), porém após 72 horas houve uma maior produção de *Mmp* após a adição de LTB₄ 0,1 μ M ou 0,01 μ M ($p < 0,05$). Destes, o efeito foi mais pronunciado na concentração de LTB₄ 0,01 μ M ($p < 0,05$) (Figura 3.5).

O gene *Ctsk*, que codifica a enzima catepsina K, não foi modulado pela adição de M-CSF + RANKL ao meio de cultura ($p > 0,05$), porém a expressão foi diminuída após adição de LTB₄ 0,01 μ M ($p < 0,05$), tanto as 48 como as 72 horas. O gene *Ccrp*, que codifica o receptor de calcitonina apresentou um comportamento distinto dependendo do período de avaliação. Após 48 horas, M-CSF + RANKL induziu a expressão ($p < 0,05$) e a adição de LTB₄ a 0,01 μ M ou 0,1 μ M inibiu a expressão até retornar ao valor basal ($p < 0,05$). Diferentemente, após 72 horas, a adição de LTB₄ a 0,01 μ M ou 0,1 μ M não influenciou a expressão induzida por M-CSF ($p > 0,05$) (Figura 3.6).

Figura 3.5. Expressão relativa dos genes *Acp5* (A, B) e *Mmp9* (C, D) que codificam as enzimas TRAP e metaloproteinase da matriz-9 respectivamente, 48 e 72 horas após estimulação de macrófagos murinos J774A.1 com M-CSF (30 ng / mL) + RANKL (10 ng / mL) contendo ou não microesferas (MS) de LTB₄ nas concentrações de 0,01 μM e 0,1 μM. * $p < 0,05$ comparado à expressão em células mantidas em meio DMEM sem soro fetal bovino (linha tracejada); # $p < 0,05$ comparado à adição de M-CSF + RANKL somente; & $p < 0,05$ comparando as diferentes concentrações de LTB₄.

Figura 3.6. Expressão relativa dos genes *Ctsk* (A, B) e *Ccrp* (C, D) que codificam a catepsina K e o receptor de calcitonina respectivamente, 48 e 72 horas após estimulação de macrófagos murinos J774A.1 com M-CSF (30 ng / mL) + RANKL (10 ng / mL) contendo ou não microesferas (MS) de LTB₄ nas concentrações de 0,01 µM e 0,1 µM. * $p < 0,05$ comparado à expressão em células mantidas em meio DMEM sem soro fetal bovino (linha tracejada); # $p < 0,05$ comparado à adição de M-CSF + RANKL somente; & $p < 0,05$ comparando as diferentes concentrações de LTB₄.

Discussão

A modulação da via pró-inflamatória 5-LO foi observada *in vitro* durante a diferenciação de células da linhagem hematopoiética em osteoclastos e a adição de microesferas contendo LTB₄ inibiu o potencial osteoclastogênico da cultura induzido pelo mediador solúvel RANKL. Estes resultados corroboram com nossas observações *in vivo* de que essa via apresenta um papel protetor durante a osteoclastogênese *in vivo*.

O processo inflamatório frente aos estímulos agressores microbianos é uma resposta do hospedeiro que visa combater a infecção e restabelecer o seu funcionamento fisiológico (Gilroy *et al.*, 2010). Citocinas e diversas moléculas de sinalização são sintetizadas e secretadas pelas células residentes do tecido, previamente ao recrutamento e ativação das células do sistema imune, gerando um padrão de resposta imune molecular (Cooper *et al.*, 2011). Neste processo, os mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico são moléculas importantes na regulação de processos homeostáticos e inflamatórios (Dennis e Norris, 2015).

No tecido ósseo, há uma inter-relação constante entre a resposta inflamatória e a reabsorção das matrizes mineralizadas. Assim, tendo em vista que observamos uma modulação positiva da via pró-inflamatória 5-LO durante a osteoclastogênese e que um estudo prévio mostrou que o LTC₄ é importante para a diferenciação osteoclástica de macrófagos derivados da medula óssea (Lee *et al.*, 2012), investigamos se o LTB₄ adicionado por via exógena poderia modificar o curso da diferenciação celular e esclarecer um possível mecanismo envolvido na resposta periapical observada em animais deficientes da enzima 5-LO.

Para a realização deste estudo, foram utilizadas microesferas como sistema *delivery* do LTB₄. A opção pelo método de encapsulação foi porque, desta forma, o LTB₄ mantém a sua atividade biológica preservada, além de constituir uma importante ferramenta de estímulo celular, de modo a proteger o mediador encapsulado da degradação (Nicolette *et al.*, 2008). Após avaliação por um período de 24 horas, sabe-se que microesferas de LTB₄ tiveram pico de liberação de 45% do mediador num período de 5 horas, podendo ser continuamente liberado por um longo período de tempo (Nicolette *et al.*, 2007). As microesferas foram preparadas utilizando como arcabouço um polímero, o ácido poli-lático co-glicólico (PLGA). O PLGA é amplamente utilizado no preparo de microesferas por ser um polímero biodegradável e

biocompatível (Fredenberg *et al.*, 2011). Este material permite liberação das moléculas encapsuladas de maneira controlada por longos períodos e a partir de uma única administração, o que mantém as concentrações da substância encapsulada constantes (Ford Versypt *et al.*, 2012).

O LTB₄ foi eficientemente encapsulado em PLGA previamente pelo grupo de pesquisa liderado pela Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli do Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sem que houvesse prejuízo no que diz respeito à sua atividade biológica. Esse polímero apresenta elevada eficiência de encapsulação, estabilidade e seus produtos de degradação (ácido láctico e glicólico) também são biocompatíveis (Bitencourt *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2015). Especificamente com relação ao LTB₄, esse sistema de *delivery* se mostra como uma alternativa relevante aos sistemas de administração de fármacos convencionais, pois além de liberarem as moléculas encapsuladas de maneira controlada em períodos mais prolongados por meio de uma única administração, mantém a estabilidade de mediadores extremamente lábeis (Ford Versypt *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2015). Mediadores lipídicos podem ser facilmente degradados, via reações de oxidação e hidrólise, e consequentemente, perderem suas propriedades biológicas (Murphy e Gijón, 2007). Portanto, a encapsulação trata-se de uma forma eficiente para a manutenção da concentração de mediadores lipídicos constante, de modo a impedir sua degradação.

Em estudo prévio, o LTB₄ foi capaz de aumentar a expressão de RANKL que, por sua vez, levou à diferenciação de osteoclastos (Chen *et al.*, 2010). Na ausência de metabólitos da via 5-LO, houve redução do recrutamento e da diferenciação de células osteoclásticas, impedindo a reabsorção óssea induzida por carga mecânica (Moura *et al.*, 2014). Porém uma comparação entre estes estudos quanto ao potencial osteoclastogênico do LTB₄ deve levar em conta alguns fatores. O primeiro é que essa modulação pode ser modificada pela presença ou não de infecção associada, assim como pela concentração utilizada do mediador. O segundo fator, e talvez mais relevante, que poderia ajudar a esclarecer possíveis divergências deste com outros estudos prévios é o sistema de *delivery* utilizado. Os trabalhos existentes literatura que avaliaram o papel do LTB₄ na osteoclastogênese (Jiang *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012; Dixit *et al.*, 2014) utilizaram o mediador na forma solúvel, que atua principalmente sobre os receptores de superfície BLT1 e BLT2. Nós utilizamos como estratégia a encapsulação em microesferas de PLGA. Essa encapsulação favorece o engolfamento das

microesferas por fagócitos como os macrófagos J774A.1 (Bitencourt *et al.*, 2015), o que permite que esse mediador seja liberado no interior da célula e sinalize via receptores nucleares da família PPAR. Microesferas poliméricas contendo LTB₄ são mais fagocitadas por macrófagos peritoneais murinos do que microesferas vazias (Nicolette *et al.*, 2007; Nicolette *et al.*, 2008), são capazes de induzir o aumento da produção de óxido nítrico em células endoteliais humanas e em macrófagos peritoneais murinos, e aumentam a expressão do receptor nuclear PPAR- α (Nicolette *et al.*, 2008). Esse mecanismo não foi demonstrado em nosso trabalho, porém acreditamos que possa ser importante e deveria ser explorado em estudos futuros com o objetivo de entender o papel dual do mediador lipídico, dependente da família de receptores que são ativados na cascata de sinalização.

A estimulação de células mononucleares humanas com M-CSF associada ao LTB₄ aumentou a expressão de genes marcadores da osteoclastogênese como *CTSK*, *MMP9* e *ACP5* (Dixit *et al.*, 2014), diferentemente do que observamos com uma cultura imortalizada de macrófagos obtidos de camundongos, na qual o LTB₄ induziu a expressão de *Mmp9* porém inibiu *Ccrp* e *Ctsk*, sem alterar *Acp5*. Estes resultados, conseguidos graças à incorporação do LTB₄ em microesferas de PLGA, demonstraram o papel protetor no mediador lipídico na inibição da diferenciação de osteoclastos.

CONCLUSÕES

De maneira geral, ao final deste trabalho, pudemos identificar novas moléculas e vias de sinalização envolvidas na paradoxal relação entre a inflamação, a osteoclastogênese e a reabsorção óssea periapical que acontecem após a invasão microbiana dos canais radiculares por micro-organismos advindos da cavidade bucal.

Especificamente, demonstramos que a contaminação dos canais radiculares por micro-organismos advindos da cavidade bucal ou pelo lipopolissacarídeo bacteriano induzem o desenvolvimento da lesão periapical experimental, caracterizada por um aumento local na síntese de RNAm para as enzimas 5-lipoxigenase e ciclo-oxigenase-2 do metabolismo do ácido araquidônico bem como de receptores de superfície (EP1-EP4 e BLT1-BLT2) e receptores nucleares (PPAR) que medeiam os efeitos biológicos dos mediadores lipídicos prostaglandina E₂ e leucotrieno B₄.

Tendo em vista que a contaminação microbiana dos canais radiculares induziu não só a inflamação periapical, mas também a reabsorção óssea, paralelamente à modulação positiva de genes que codificam proteínas e receptores da via 5-LO, aprofundamos nossa investigação nessa linha. Observamos que diversos mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas são induzidos pela contaminação dos canais radiculares e na ausência da via 5-LO têm sua produção inibida. Diferentemente, os reguladores da osteoclastogênese e a ativação de osteoclastos *in vivo* são negativamente modulados pela via 5-LO, ainda que esse possível papel protetor não tenha impedido a reabsorção óssea periapical.

Quando investigado *in vitro*, utilizando uma cultura de células da linhagem monocítica, o leucotrieno B₄, um dos produtos da via 5-lipoxigenase, inibiu a transcrição de genes condizentes com um fenótipo osteoclástico e ativação das células, mensurada por meio da atividade da enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato.

Em conjunto, estes resultados mostram que a via 5-LO e o mediador lipídico leucotrieno B₄ apresentam um papel importante na regulação da síntese de mediadores inflamatórios na lesão periapical e um papel protetor na sinalização osteoclastogênica, prevenindo a formação e atividade de osteoclastos. Não obstante, essa paradoxal relação entre a inflamação e a sinalização osteoclastogênica, não impediu a reabsorção óssea durante o desenvolvimento da lesão periapical.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A investigação de vias sinalizadoras ativadas na reabsorção óssea periapical e, portanto, a descoberta de novos mediadores envolvidos na patologia periapical poderão determinar novas estratégias terapêuticas. O objetivo é implementá-las na prática clínica, visando a modulação farmacológica da inflamação em dentes com lesão periapical para obter um prognóstico mais favorável pós-tratamento de canais radiculares. A necessidade de estudos nesta área ainda encontra justificativa no fato de que a taxa estimada de sucesso clínico-radiográfico, a longo prazo, do tratamento de canais radiculares convencional varia de 64 a 86% dos casos (Kojima *et al.*, 2004; Sathorn *et al.*, 2005; Ng *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009; Paredes-Vieyra e Enriquez, 2012; Pirani *et al.*, 2015; Burry *et al.*, 2016). A identificação dos mediadores bioquímicos envolvidos (i) no desenvolvimento, progressão e maturação das lesões periapicais bem como os mediadores envolvidos (ii) na reabsorção óssea propriamente dita, fornecerão embasamento científico para a implementação de terapêuticas alternativas ou associadas aos medicamentos convencionais, com o objetivo de permitir o reparo dos tecidos cementários e ósseo em tempo mais oportuno.

Nos últimos anos, nosso grupo demonstrou que duas vias de metabolismo do ácido araquidônico, lipoxigenase e ciclo-oxigenase, estão envolvidas na perda óssea periapical (Santos, 2012; Santos, 2015; Paula-Silva *et al.*, 2016). Entretanto, as tentativas no sentido de controlar a reabsorção utilizando medicamentos anti-inflamatórios não tem mostrado bons resultados. Frente a essa dificuldade, passamos a considerar também que a inibição de uma única via pode não resultar em um desfecho clínico favorável. Por esta razão, os estudos em cultura de células utilizando como estratégia terapêutica microesferas contendo mediadores lipídicos, com o objetivo de estabelecer mecanismos de contra-balanço e *feedback* da resposta pró-inflamatória, têm se mostrado relevantes. Todavia, estes estudos ainda estão distantes da real aplicação terapêutica, em larga escala, na Odontologia.

REFERÊNCIAS

- Abou-Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endod J* 1998;31:39-47.
- Alptekin NO, Ari H, Haliloglu S, Alptekin T, Serpek B, Ataoglu T. The effect of endodontic therapy on periapical exudate neutrophil elastase and prostaglandin-E2 levels. *J Endod* 2005;31(11):791-5.
- Anandarajah AP. Role of RANKL in bone diseases. *Trends Endocrinol Metab* 2009;20(2):88-94.
- Araujo-Pires AC, Francisconi CF, Biguetti CC, Cavalla F, Aranha AM, Letra A, Trombone AP, Faveri M, Silva RM, Garlet GP. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. *J Appl Oral Sci* 2014;22(4):336-46.
- Aronoff DM, Canetti C, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. *J Immunol* 2004;173(1):559-65.
- Assed S, Ito IY, Leonardo MR, Silva LAB, Lopatin DE. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. *Endod Dent Traumatol* 1996;12:66-9.
- Back M, Powell WS, Dahlen SE, Drazen JM, Evans JF, Serhan CN, et al. Update on leukotriene, lipoxin and oxoeicosanoid receptors: IUPHAR Review 7. *Br J Pharmacol* 2014;171(15):3551-74.
- Bambirra W Jr, Maciel KF, Thebit MM, de Brito LC, Vieira LQ, Sobrinho AP. Assessment of Apical Expression of Alpha-2 Integrin, Heat Shock Protein, and Proinflammatory and Immunoregulatory Cytokines in Response to Endodontic Infection. *J Endod* 2015;41(7):1085-90.
- Bar-Shavit Z. The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *J Cell Biochem* 2007;102(5):1130-9.
- Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L, Redini F, Heymann D. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. *Cell Mol Life Sci* 2007;64(18):2334-50.
- Baumgartner JC, Falkler-Junior WA. Bacteria in the apical 5mm of infected root canals. *J Endod* 1991;17:380-3.
- Belibasakis GN, Rechenberg DK, Zehnder M. The receptor activator of NF- κ B ligand-osteoprotegerin system in pulpal and periapical disease. *Int Endod J* 2013;46(2):99-111.

Bendre MS, Montague DC, Peery T, Akel NS, Gaddy D, Suva LJ. Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone* 2003;33(1):28-37.

Bitencourt CS, Silva LB, Pereira PA, Gelfuso GM, Faccioli LH. Microspheres prepared with different co-polymers of poly(lactic-glycolic acid) (PLGA) or with chitosan cause distinct effects on macrophages. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2015;136:678-86.

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

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

Boyce BF. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. *J Dent Res* 2013;92(10):860-7.

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

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

Brito LC, Teles FR, Teles RP, Totola AH, Vieira LQ, Sobrinho AP. T-lymphocyte and cytokine expression in human inflammatory periapical lesions. *J Endod* 2012;38(4):481-5.

Burry JC, Stover S, Eichmiller F, Bhagavatula P. Outcomes of Primary Endodontic Therapy Provided by Endodontic Specialists Compared with Other Providers. *J Endod* 2016;42(5):702-5.

Campos K, Gomes CC, de Fátima Correia-Silva J, Farias LC, Fonseca-Silva T, Bernardes VF, Pereira CM, Gomez RS. Methylation pattern of IFNG in periapical granulomas and radicular cysts. *J Endod* 2013;39(4):493-6.

Capra V, Rovati GE, Mangano P, Buccellati C, Murphy RC, Sala A. Transcellular biosynthesis of eicosanoid lipid mediators. *Biochim Biophys Acta* 2015;1851(4):377-382.

Cardozo-Pereira AL, Bortolini Bolzani FC, Stefani M, Charlín R. Uso sistêmico de corticosteróides: revisão da literatura. *Med Cutan Iber Lat Am* 2007;35:35-50.

Carvalho Fraga CA, Alves LR, de Sousa AA, de Jesus SF, Vilela DN, Pereira CS, Batista Domingos PL, Viana AG, Jham BC, Batista de Paula AM, Sena Guimarães AL. Th1 and Th2-like protein balance in human inflammatory radicular cysts and periapical granulomas. *J Endod* 2013;39(4):453-5.

Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM. PPAR-gamma dependent and

independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* 2001;7:48–52.

Chen ZK, Lv HS, Jiang J. LTB₄ Can Stimulate Human Osteoclast Differentiation Dependent of RANKL. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2010; 38, 52-6.

Chuang FH, Tsai CC, Chen JH, Chen KK, Chen YK, Lin YC. Long-term sequential receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegrin (OPG) expression in lipopolysaccharide-induced rat periapical lesions. *J Oral Pathol Med* 2012;41(2):186-93.

Contran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins: patologia estrutural e funcional. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2000.

Cooper PR, McLachlan JL, Simon S, Graham LW, Smith AJ. Mediators of inflammation and regeneration. *Adv Dent Res* 2011;23(3):290-5.

Cotti E, Schirru E, Acquas E, Usai P. An overview on biologic medications and their possible role in apical periodontitis. *J Endod* 2014;40:1902–11.

Cotti E, Torabinejad M. Detection of leukotriene C₄ in human periradicular lesions. *Int Endod J* 1994;27(2):82-6.

Cottrell JA, O'Connor JP. Pharmacological inhibition of 5-lipoxygenase accelerates and enhances fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91(11):2653-65.

Dahlen G, Bergenholtz G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. *J Dent Res* 1980;59:1033-40.

Daltoé MO, Paula-Silva FW, Faccioli LH, Gatón-Hernández PM, De Rossi A, Bezerra Silva LA. Expression of Mineralization Markers during Pulp Response to Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 2016;42(4):596-603.

De Rossi A, Rocha LB, Rossi MA. Molecule-1, and chemokine receptor 5, but not interleukin-4, attenuate the development of periapical lesions. *J Endod* 2008;34:31-8.

Dennis EA, Norris PC. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2015; 15(8):511-23.

Di Paola R, Briguglio F, Paterniti I, Mazzon E, Oteri G, Mili D, Cordasco G, Cuzzocrea S. Emerging role of PPAR- β/δ in inflammatory process associated to experimental periodontitis. *Mediators Inflamm* 2011;2011:787159.

Dixit N, Wu DJ, Belgacem YH, Borodinsky LN, Gershwin ME, Adamopoulos IE. Leukotriene B₄ activates intracellular calcium and augments human osteoclastogenesis. *Arthritis Res Ther* 2014;16:496.

Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central

surveillance. *Science* 2000;289(5484):1501-4.

Eberhard J, Plagmann HC. Changes in the periodontal membrane due to apical periodontitis. *J Endod* 1999;25:486-9.

Eder A, Koegl E, von Duvillard SP, Sinzinger H, Berent R. Influence of cigarette smoking on synthesis of eicosanoids, isoprostanes and lipoxygenase metabolites in apical periodontitis. *Arch Oral Biol* 2012;57(8):1133-40.

Engbaek K, Johansen KS, Jensen ME. A new technique for Gram staining paraffin-embedded tissue. *J Clin Pathol* 1979;32(2):187-90.

Ford Versypt AN, Pack DW, Braatz RD. Mathematical modeling of drug delivery from autocatalytically degradable PLGA microspheres — A review. *J Control Release* 2013;165, 29-37.

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

Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems--a review. *Int J Pharm* 2011;415(1-2):34-52.

Fukada SY, Silva TA, Saconato IF, Garlet GP, Avila-Campos MJ, Silva JS, Cunha FQ. iNOS-derived nitric oxide modulates infection-stimulated bone loss. *J Dent Res* 2008;87(12):1155-9.

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

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

Garcia C, Boyce BF, Gilles J, Dallas M, Qiao M, Mundy GR, *et al.* Leukotriene B4 stimulates osteoclastic bone resorption both in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res.* 1996;11(11):1619-27.

García CC, Sempere FV, Diago MP, Bowen EM. The post-endodontic periapical lesion: histologic and etiopathogenic aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007;12:E585-590.

Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, Silva JS. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21(1):12-20.

Garlet GP, Martins W Jr, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J*

Periodontal Res 2003;38(2):210-7.

Garrido M, Dezerega A, Bordagaray MJ, Reyes M, Vernal R, Melgar-Rodríguez S, Ciuchi P, Paredes R, García-Sesnich J, Ahumada-Montalva P, Hernández M. C-reactive protein expression is up-regulated in apical lesions of endodontic origin in association with interleukin-6. *J Endod* 2015;41(4):464-9.

Gilroy DW. Eicosanoids and the endogenous control of acute inflammatory resolution. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42(4):524-8.

Graunaite I, Lodiene G, Maciulskiene V. Pathogenesis of Apical Periodontitis: a Literature Review. *Journal of Oral & Maxillofacial Research* 2011; 2(4):e1.

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

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

Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990;265:621-36.

Hikiji H, Ishii S, Yokomizo T, Takato T, Shimizu T. A distinctive role of the leukotriene B4 receptor BLT1 in osteoclastic activity during bone loss. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(50):21294-9.

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

Hirata T, Narumiya S. Prostanoids as regulators of innate and adaptive immunity. *Adv Immunol* 2012;116:143-74.

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

Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM, Chen CS, Lin LD, Wang JS. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med* 2004;33:162-9.

Ito IY, Junior FM, Paula-Silva FW, Da Silva LA, Leonardo MR, Nelson-Filho P. Microbial culture and checkerboard DNA-DNA hybridization assessment of bacteria in root canals of primary teeth pre- and post-endodontic therapy with a calcium hydroxide/chlorhexidine paste. *Int J Paediatr Dent* 2011;21(5):353-60.

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

Jiang J, LV HS, Lin JH, Jiang DF, Chen ZK. LTB4 can directly stimulate human osteoclast formation from PBMC independent of RANKL. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2005; 33, 391-403.

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

Kabak SL, Kabak YS, Anischenko SL. Light microscopic study of periapical lesions associated with asymptomatic apical periodontitis. *Ann Anat* 2005;187:185-194.

Kabashima H, Yoneda M, Nagata K, Hirofuji T, Maeda K. The presence of chemokine (MCP-1, MIP-1alpha, MIP-1beta, IP-10, RANTES)-positive cells and chemokine receptor (CCR5, CXCR3)-positive cells in inflamed human gingival tissues. *Cytokine* 2002;20(2):70-7.

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-9.

Kanaoka Y, Boyce JA. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. *J Immunol* 2004;173(3):1503-10.

Kang JH, Ko HM, Moon JS, Yoo HI, Jung JY, Kim MS, Koh JT, Kim WJ, Kim SH. Osteoprotegerin expressed by osteoclasts: an autoregulator of osteoclastogenesis. *J Dent Res*. 2014;93(11):1116-23.

Kantz WE, Henry CA. Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact chambers of non-vital teeth in man. *Arch Oral Biol* 1974;19:91-6.

Kawahara K, Hohjoh H, Inazumi T, Tsuchiya S, Sugimoto Y. Prostaglandin E-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochim Biophys Acta* 2015;1851(4):414-21.

Kawahara T, Murakami S, Noiri Y, Ehara A, Takemura N, Furukawa S, Ebisu S. Effects of cyclosporin-A-induced immunosuppression on periapical lesions in rats. *J Dent Res* 2004;83(9):683-7.

Kawashima N, Stashenko P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol* 1999;44:55-66.

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

Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and

osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev* 2008;29(2):155-92.

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

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

Kojima K, Inamoto K, Nagamatsu K, Hara A, Nakata K, Morita I, *et al.* Success rate of endodontic treatment of teeth with vital and nonvital pulps. A meta-analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:95-9.

Kwak HB, Lee SW, Jin HM, Ha H, Lee SH, Takeshita S, *et al.* Monokine induced by interferon-gamma is induced by receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and is involved in osteoclast adhesion and migration. *Blood* 2005;105(7):2963-9.

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

Le Bel M, Brunet A, Gosselin J. Leukotriene B4, an endogenous stimulator of the innate immune response against pathogens. *J Innate Immun* 2014;6(2):159-68.

Lee EG, Sung MS, Yoo HG, Chae HJ, Kim HR, Yoo WH. Increased RANKL-mediated osteoclastogenesis by interleukin-1 β and endoplasmic reticulum stress. *Joint Bone Spine* 2014;81(6):520-6.

Lee JM, Park H, Noh AL, Kang JH, Chen L, Zheng T, Lee J, Ji SY, Jang CY, Shin CS, Ha H, Lee ZH, Park HY, Lee DS, Yim M. 5-Lipoxygenase mediates RANKL-induced osteoclast formation via the cystenyl leukotriene receptor 1. *J Immunol* 2012; 189, 5284-92.

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

Legler DF, Bruckner M, Uetz-von Allmen E, Krause P. Prostaglandin E2 at new glance: novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42(2):198-201.

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

Leite ACRM, Cunha FQ, Dal-Secco D, Fukada SY, Girão VCC, Rocha FAC. Effects of nitric oxide on neutrophil influx depends on the tissue: role of leukotriene B4 and adhesion molecules. *Br J Pharmacol* 2009;156:818-25.

Leonardo MR, Rossi MA, Silva LAB, Ito IY, Bonifácio KC. EM evaluation of bacterial biofilm and

microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *J Endod* 2002;28:815-8.

Leonardo MR, Silva RAB, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of Bacterial Endotoxin (LPS) in Endodontics. *J Appl Oral Sci* 2004;12(2):93-8.

Leonardo MR. Endodontia: tratamento de canais radiculares. Princípios técnicos e biológicos. São Paulo: Artes Médicas; 2008.

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

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

Lin HN, O'Connor JP. Immunohistochemical localization of key arachidonic acid metabolism enzymes during fracture healing in mice. *PLoS One* 2014;9(2):e88423.

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

Marçal JR, Samuel RO, Fernandes D, de Araujo MS, Napimoga MH, Pereira SA, Clemente-Napimoga JT, *et al.* T-helper cell type 17/regulatory T-cell immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. *J Endod* 2010;36(6):995-9.

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

Martinho FC, Chiesa WMM, Leite FRM, Cirelli JA, Gomes BPFA. Correlation between Clinical/Radiographic Features and Inflammatory Cytokine Networks Produced by Macrophages Stimulated with Endodontic Content. *J Endod* 2012; 38(6):740-745.

Martón IJ, Kiss C. Overlapping protective and destructive regulatory pathways in apical periodontitis. *J Endod* 2014;40:155–63.

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

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

Mc Gee JOD, Isaacson PG, Wright NA. Oxford textbook of pathology. Principles of pathology. Oxford: University Press; 1992.

McCoy EM, Hong H, Pruitt HC, Feng X. IL-11 produced by breast cancer cells augments osteoclastogenesis by sustaining the pool of osteoclast progenitor cells. *BMC Cancer*

2013;13:16.

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

Medeiros AI, Sá-Nunes A, Turato WM, Secatto A, Frantz FG, Sorgi CA, Serezani CH, Deepe GS Jr, Faccioli LH. Leukotrienes are potent adjuvant during fungal infection: effects on memory T cells. *J Immunol* 2008;181(12):8544-51.

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

Mehrabian M, Allayee H, Stockton J, Lum PY, Drake TA, Castellani LW, Suh M, Armour C, Edwards S, Lamb J, Lusi AJ, Schadt EE. Integrating genotypic and expression data in a segregating mouse population to identify 5-lipoxygenase as a susceptibility gene for obesity and bone traits. *Nat Genet* 2005;37(11):1224-33.

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

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

Mikos AG, Lyman MD, Freed LE, Langer R. Wetting of poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams for tissue culture. *Biomaterials* 1994;15(1):55-8.

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

Moura AP, Taddei SR, Queiroz-Junior CM, Madeira MF, Rodrigues LF, Garlet GP, et al. The relevance of leukotrienes for bone resorption induced by mechanical loading. *Bone* 2014;69:133-8.

Murphy RC, Gijón MA. Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. *Biochem J* 2007;405(3):379-95.

Nair PN. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol* 2000 1997;13:121-48.

Nakamura K, Yamasaki M, Nishigaki N, Iwama A, Imaizumi I, Nakamura H, Kameyama Y. Effect of methotrexate-induced neutropenia on pulpal inflammation in rats. *J Endod* 2002;28(4):287-90.

Nakashima T, Takayanagi H. The dynamic interplay between osteoclasts and the immune system. *Arch Biochem Biophys* 2008;473(2):166-71.

Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid Receptors: Structures , properties, and functions. *Physiol Rev* 1999;70:1193-1226.

Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva LAB, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod* 2002;28:694-6.

Ng YL, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J, Gulabivala K. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature. Part 1: effects of study characteristics on probability of success. *Int Endod J* 2007;40:921–39.

Ng YL, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J, Gulabivala K. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature. Part 2: influence of clinical factors. *Int Endod J* 2008;41:6-31.

Nicolete R, Lima Kde M, Júnior JM, Baruffi MD, de Medeiros AI, Bentley MV, Silva CL, Faccioli LH. In vitro and in vivo activities of leukotriene B4-loaded biodegradable microspheres. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2007;83(1-2):121-9.

Nicolete R, Rius C, Piqueras L, Jose PJ, Sorgi CA, Soares EG, Sanz MJ, Faccioli LH. Leukotriene B4-loaded microspheres: a new therapeutic strategy to modulate cell activation. *BMC Immunol* 2008 15;9:36.

Nicolete R, Secatto A, Pereira PA, Soares EG, Faccioli LH. Leukotriene B4-loaded microspheres as a new approach to enhance antimicrobial responses in *Histoplasma capsulatum*-infected mice. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34(4):365-9.

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

Oka H, Miyauchi M, Furusho H, Nishihara T, Takata T. Oral administration of prostaglandin E(2)-specific receptor 4 antagonist inhibits lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis in rat periodontal tissue. *J Periodontol* 2012 Apr;83(4):506-13.

Oliveira KM, da Silva RA, De Rossi A, Fukada SY, Feres M, Nelson-Filho P, da Silva LA. Absence of interleukin 22 affects the oral microbiota and the progression of induced periapical lesions in murine teeth. *Int Endod J* 2015;48(1):46-59.

Onçag O, Hosgor M, Hilmioglu S, Zekioglu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J* 2003;36:423-32.

Ørstavik D, Pitt-Ford TR. Apical periodontitis: microbial infection and host responses. In: Ørstavik D, Pitt-Ford TR, eds. *Essential Endodontology*. Oxford: Blackwell Science; 1998; p. 1-8.

Paredes-Vieyra J, Enriquez FJ. Success rate of single- versus two-visit root canal treatment of teeth with apical periodontitis: a randomized controlled trial. *J Endod* 2012;38(9):1164-9.

Paula-Silva FW, Ghosh A, Arzate H, Kapila S, da Silva LA, Kapila YL. Calcium hydroxide promotes cementogenesis and induces cementoblastic differentiation of mesenchymal periodontal ligament cells in a CEMP1- and ERK-dependent manner. *Calcif Tissue Int* 2010; 87(2):144-57.*a*

Paula-Silva FW, Petean IB, da Silva LA, Faccioli LH. Dual Role of 5-Lipoxygenase in Osteoclastogenesis in Bacterial-induced Apical Periodontitis. *J Endod* 2016;42(3):447-54.

Paula-Silva FWG, D'Silva NJ, Silva LAB, Kapila YL. High matrix metalloproteinase activity is a hallmark of periapical granulomas. *J Endod* 2009;35(9):1234-42.*e*

Paula-Silva FWG, Ghosh A, Silva LAB, Kapila YL. TNF- α induces an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. *J Dent Research* 2009; 88(4):339-344.*a*

Paula-Silva FWG, Hassan B, Silva LAB, Leonardo MR, Wu M-K. Outcome of root canal treatment in dogs determined by periapical radiography and cone-beam computed tomography scans. *J Endod* 2009;35(5):723-6.*b*

Paula-Silva FWG, Queiroz AM, Díaz-Serrano KV, Silva LAB, Ito IY. Reação inflamatória periapical: repercussões sistêmicas? *Odontol Clín Cient* 2010;9(4):299-302.

Paula-Silva FWG, Santamaria-Junior M, Leonardo MR, Consolaro A, Silva LAB. Cone-beam computerized tomographic, radiographic, and histologic evaluation of periapical repair in dogs' post-endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108(5):796-805.*d*

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

Paula-Silva FWG, Wu M-K, Silva LAB, Leonardo MR, Wesselink PR. Accuracy of periapical radiography and cone-beam computed tomography in diagnosing apical periodontitis using histopathological findings as a gold standard. *J Endod* 2009; 35(7):1009-12.*c*

Pereira PA, da Silva Bitencourt C, Dos Santos DF, Nicolete R, Gelfuso GM, Faccioli LH. Prostaglandin D-loaded microspheres effectively activate macrophage effector functions. *Eur J Pharm Sci* 2015;78:132-9.

Peters-Golden M, Henderson WR Jr. Leukotrienes. *N Engl J Med* 2007;357(18):1841-54.
Pidgeon GP, Lysaght J, Krishnamoorthy S, Reynolds JV, O'Byrne K, Nie D, *et al.* Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26(3-4):503-24.

Pirani C, Chersoni S, Montebugnoli L, Prati C. Long-term outcome of non-surgical root canal treatment: a retrospective analysis. *Odontology* 2015;103(2):185-93.

Powell WS, Rokach J. Biosynthesis, biological effects, and receptors of hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) and oxoeicosatetraenoic acids (oxo-ETEs) derived from arachidonic acid. *Biochim Biophys Acta* 2015;1851(4):340-55.

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

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

Rådmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B. 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2015;1851(4):331-9.

Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem* 2010;285:25103-8.

Ramadori G, Christ B. Cytokines and the hepatic acute-phase response. *Sem Liver Dis* 1999;19:141-55.

Ren W, Dziak R. Effects of leukotrienes on osteoblastic cell proliferation. *Calcif Tissue Int.* 1991;49(3):197-201.

Richardson C, Emery P. Laboratory markers of disease activity. *J Rheumatol* 1996;(Suppl 44)23:23-30.

Ricucci D, Russo J, Rutberg M, Burleson JA, Spångberg LS. A prospective cohort study of endodontic treatments of 1,369 root canals: results after 5 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112(6):825-42.

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

Rocha CT, Rossi MA, Leonardo MR, Rocha LB, Nelson-Filho P, Silva LA. Biofilm on the apical region of roots in primary teeth with vital and necrotic pulps with or without radiographically evident apical pathosis. *Int Endod J* 2008;41:664-9.

Ruvière DB, Leonardo MR, da Silva LA, Ito IY, Nelson-Filho P. Assessment of the microbiota in root canals of human primary teeth by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Dent Child* 2007 May-Aug;74(2):118-23.

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

Santos DF, Bitencourt CS, Gelfuso GM, Pereira PA, de Souza PR, Sorgi CA, Nicolette R, Faccioli LH. Biodegradable microspheres containing leukotriene B(4) and cell-free antigens from *Histoplasma capsulatum* activate murine bone marrow-derived macrophages. *Eur J Pharm Sci* 2011 18;44(5):580-8.

Santos FRR. Ciclo-oxigenase-2 modula in vivo a expressão de marcadores da osteoclastogênese e genes envolvidos no metabolismo ósseo em resposta ao lipopolissacarídeo bacteriano. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo 2012; 74p. Orientador: Paula-Silva FWG.

Santos FRR. Papel da via ciclo-oxigenase na inflamação e reabsorção óssea periapical induzidas pelo lipopolissacarídeo bacteriano. Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo 2015; 157p. Orientador: Paula-Silva FWG.

Sasaki H, Hirai K, Martins CM, Furusho H, Battaglini R, Hashimoto K. Interrelationship Between Periapical Lesion and Systemic Metabolic Disorders. *Curr Pharm Des* 2016;22(15):2204-15.

Sasaki H, Hou L, Belani A, Wang CY, Uchiyama T, Müller R, Stashenko P. IL-10, but not IL-4, suppresses infection-stimulated bone resorption in vivo. *J Immunol* 2000;165(7):3626-30.

Sathorn C, Parashos P, Messer HH. Effectiveness of single- versus multiple-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J* 2005;38:347-55.

Secatto A, Soares EM, Locachevic GA, Assis PA, Paula-Silva FW, Serezani CH, de Medeiros AI, Faccioli LH. The leukotriene B₄/BLT₁ axis is a key determinant in susceptibility and resistance to histoplasmosis. *PLoS One* 2014 21;9(1):e85083.

Segura-Egea JJ, Martín-González J, Castellanos-Cosano L. Endodontic medicine: connections between apical periodontitis and systemic diseases. *Int Endod J* 2015;48(10):933-51.

Seltzer S. Endodontology: biologic considerations in endodontic procedures. Philadelphia: Lea & Febiger; 1988.

Serezani CH, Chung J, Ballinger MN, Moore BB, Aronoff DM, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 suppresses bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 37(5):562-70.

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

Shovelton DS. The presence and distribution of microorganisms within non-vital teeth. *Br Dent J* 1964;117:101-7.

Silva LA, Leonardo MR, Assed S, Tanomaru Filho M. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. *Braz Dent J* 2004;15:109-14.

Silva LAB, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod* 2002;28:94-8.

Silva LAB, Silva RAB, Branco LGS, Navarro VP, Nelson-Filho P. Quantitative Radiographic Evaluation of Periapical Bone Resorption in Dog's Teeth Contaminated With Bacterial

Endotoxin (LPS) Associated or not with Calcium Hydroxide. *Braz Dent J* 2008; 19(4):296-300.

Silva RA, Ferreira PD, De Rossi A, Nelson-Filho P, Silva LA. Toll-like receptor 2 knockout mice showed increased periapical lesion size and osteoclast number. *J Endod* 2012;38(6):803-13.

Silva RAB, Nelson-Filho P, Lucisano MP, De Rossi A, de Queiroz AM, Bezerra da Silva LA. MyD88 knockout mice develop initial enlarged periapical lesions with increased numbers of neutrophils. *Int Endod J* 2014;47(7):675-86.

Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res* 2007;86(4):306-19.

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

Siqueira-Junior JF, Rôças IN, Alves FR, Santos KR. Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canals: a molecular investigation. *J Endod* 2004;30:638-43.

Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, Goodson JM. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:352-62.

Socransky SS, Haffajee AD. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. *J Periodontal Res* 1991;26:195-212.

Stashenko P, Yu SM. T helper and T suppressor cell reversal during the development of induced rat periapical lesions. *J Dent Res* 1989;65:830-4.

Stashenko P. The role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:89-96.

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

Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E Receptors. *Journal Biological Chemistry* 2007; 282(16):11613-7.

Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol* 1992;7:257-62.

Szatmari I, Nagy L. Nuclear receptor signalling in dendritic cells connects lipids, the genome and immune function. *EMBO J* 2008;27:2353-2362.

Tager AM, Luster AD. BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003;69(2-3):123-34.

- Tani-Ishii N, Wang C-T, Tanner A, Stashenko P. Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1994;9:129-35.
- Tay JY, Bay BH, Yeo JF, Harris M, Meghji S, Dheen ST. Identification of RANKL in osteolytic lesions of the facial skeleton. *J Dent Res* 2004;83:349-53.
- Teixeira-Salum TB, Rodrigues DB, Gervásio AM, Souza CJ, Rodrigues V Jr, Loyola AM. Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granuloma and radicular cysts. *J Oral Pathol Med* 2010;39(3):250-6.
- Thomas MV, Puleo DA. Infection, Inflammation, and Bone Regeneration. *J Dent Res* 2011;90(9):1052-61.
- Torabinejad M, Cotti E, Jung T. Concentrations of leukotriene B4 in symptomatic and asymptomatic periapical lesions. *J Endod* 1992;18(5):205-8.
- Traianedes K, Dallas MR, Garrett IR, Mundy GR, Bonewald LF. 5-Lipoxygenase metabolites inhibit bone formation in vitro. *Endocrinology*. 1998;139(7):3178-84.
- Tronstad L. Recent development in endodontic research. *Scand J Dent Res* 1992;100:52-9.
- Trouvin AP, Goeb V. Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clin Interv Aging* 2010;5:345-54.
- Umezū A, Kaneko N, Toyama Y, Watanabe Y, Itoh H. Appearance of osteoclasts by injections of lipopolysaccharides in rat periodontal tissue. *J Periodontal Res* 1989;24:378-83.
- Vardar S, Buduneli E, Baylas H, Berdeli AH, Buduneli N, Atilla G. Individual and combined effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor and omega-3 fatty acid on endotoxin-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2005;76(1):99-106.
- Walker KF, Lappin DF, Takahashi K, Hope J, MacDonald DG, Kinane DF. Cytokine expression in periapical granulation tissue as assessed by immunohistochemistry. *Eur J Oral Sci* 2000;108:195-201.
- Wang CY, Stashenko P. Kinetics of bone-resorbing activity in developing periapical lesions. *J Dent Res* 1991;70:1362-6.
- Wang CY, Stashenko P. The role of interleukin-1 α in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. *Oral Microbiol Immunol* 1993;8:50-6.
- Wang Z, McCauley LK. Osteoclasts and odontoclasts: signaling pathways to development and disease. *Oral Dis* 2011;17:129-42.
- Waterman-Junior PA, Torabinejad M, McMillan PJ, Kettering JD. Development of periradicular lesions in immunosuppressed rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85(6):720-5.

Williams KI, Higgs GA. Eicosanoids and inflammation. *J Pathol* 1988;156:101-10.

Wixted JJ, Fanning PJ, Gaur T, O'Connell SL, Silva J, Mason-Savas A, Ayers DC, Stein GS, Lian JB. Enhanced fracture repair by leukotriene antagonism is characterized by increased chondrocyte proliferation and early bone formation: a novel role of the cysteinyl LT-1 receptor. *J Cell Physiol*. 2009;221(1):31-9.

Wright LM, Maloney W, Yu X, Kindle L, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Stromal cell-derived factor-1 binding to its chemokine receptor CXCR4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment, development and survival of human osteoclasts. *Bone* 2005;36(5):840-53.

Wu MK, Shemesh H, Wesselink PR. Limitations of previously published systematic reviews evaluating the outcome of endodontic treatment. *Int Endod J* 2009;42:656-66.

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

Yamasaki M, Kumazawa M, Kohsaka T, Nakamura H. Effect of methotrexate-induced neutropenia on rat periapical lesion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;77:655-661.

Yamasaki M, Morimoto T, Tsuji M, Akihiro I, Maekawa Y, Nakamura H. Role of IL-2 and helper T-lymphocytes in limiting periapical pathosis. *J Endod* 2006;32(1):24-9.

Yang M, Mailhot G, MacKay CA, Mason-Savas A, Aubin J, Odgren PR. Chemokine and chemokine receptor expression during colony stimulating factor-1-induced osteoclast differentiation in the toothless osteopetrotic rat: a key role for CCL9 (MIP-1gamma) in osteoclastogenesis in vivo and in vitro. *Blood* 2006;107(6):2262-70.

Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2004;19:2065-77.

Zhang J, Huang X, Lu B, Zhang C, Cai Z. Can apical periodontitis affect serum levels of CRP, IL-2, and IL-6 as well as induce pathological changes in remote organs? *Clin Oral Investig* 2015. *In press*.

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

Zhao Q, Shao J, Chen W, Li YP. Osteoclast differentiation and gene regulation. *Front Biosci* 2007; 12, 2519-29.

Zoccal KF, Bitencourt CS, Paula-Silva FW, Sorgi CA, de Castro Figueiredo Bordon K, Arantes EC, Faccioli LH. TLR2, TLR4 and CD14 recognize venom-associated molecular patterns from *Tityus serrulatus* to induce macrophage-derived inflammatory mediators. *PLoS One* 2014 7;9(2):e88174.

Zoccal KF, Paula-Silva FW, Bitencourt CS, Sorgi CA, Bordon K de C, Arantes EC, Faccioli LH.

PPAR- γ activation by *Tityus serrulatus* venom regulates lipid body formation and lipid mediator production. *Toxicon* 2015;93:90-7.

Zoccal KF, Sorgi CA, Hori JI, Paula-Silva FW, Arantes EC, Serezani CH, Zamboni DS, Faccioli LH. Opposing roles of LTB4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. *Nat Commun* 2016 23;7:10760.

APÊNDICE

Tabela Suplementar 1. Expressão gênica avaliada pelo RT-PCR *array* para citocinas e receptores envolvidos na inflamação, aos 7, 14, 21 e 28 dias após contaminação dos canais radiculares de molares de camundongos 129 (*wild type*).

Gene	129 (<i>wild type</i>)									
	Hígido		Lesão (7 dias)		Lesão (14 dias)		Lesão (21 dias)		Lesão (28 dias)	
	Expressão Relativa	Desvio-padrão	Expressão Relativa	Desvio-padrão	Expressão Relativa	Desvio-padrão	Expressão Relativa	Desvio-padrão	Expressão Relativa	Desvio-padrão
<i>Abcf1</i>	1,00	0,12	2,53	0,10	1,97	0,11	1,29	0,11	1,64	0,11
<i>Bl6</i>	1,00	0,13	0,74	0,11	0,89	0,11	0,75	0,11	0,69	0,11
<i>C3</i>	1,00	0,11	0,61	0,12	0,44	0,14	0,83	0,13	1,49	0,10
<i>Casp1</i>	1,00	0,11	0,99	0,10	0,43	0,11	1,16	0,11	0,82	0,10
<i>Ccl11</i>	1,00	0,12	1,30	0,12	1,61	0,13	1,11	0,11	1,31	0,12
<i>Ccl19</i>	1,00	0,11	1,81	0,11	0,97	0,12	1,25	0,11	5,49	0,10
<i>Ccl2</i>	1,00	0,12	25,32	0,11	3,77	0,10	4,45	0,11	9,63	0,11
<i>Ccl22</i>	1,00	0,12	3,87	0,11	2,03	0,11	2,52	0,13	5,34	0,10
<i>Ccl24</i>	1,00	0,13	1,16	0,12	1,09	0,11	1,06	0,12	1,15	0,12
<i>Ccl7</i>	1,00	0,13	11,41	0,11	2,15	0,12	2,93	0,11	4,55	0,09
<i>Ccr1</i>	1,00	0,11	1,76	0,11	0,55	0,11	0,99	0,10	0,76	0,10
<i>Ccr2</i>	1,00	0,11	0,30	0,10	0,34	0,11	0,41	0,11	0,78	0,13
<i>Ccr3</i>	1,00	0,12	0,99	0,11	0,55	0,11	1,09	0,12	1,10	0,09
<i>Ccr4</i>	1,00	0,13	1,07	0,11	2,36	0,11	1,24	0,12	2,94	0,11
<i>Ccr5</i>	1,00	0,11	1,62	0,09	1,01	0,10	1,42	0,12	4,83	0,11
<i>Cxcl1</i>	1,00	0,13	3,33	0,12	0,82	0,11	1,27	0,10	0,62	0,11
<i>Cxcl12</i>	1,00	0,11	0,26	0,11	0,21	0,11	0,42	0,09	0,58	0,09
<i>Pf4</i>	1,00	0,10	0,36	0,10	0,55	0,11	0,28	0,11	0,42	0,11
<i>Cxcr3</i>	1,00	0,09	1,03	0,10	0,94	0,11	1,88	0,12	8,95	0,11
<i>Cxcr10</i>	1,00	0,13	0,40	0,11	0,98	0,11	0,54	0,12	1,02	0,11
<i>Il10ra</i>	1,00	0,11	1,70	0,09	1,06	0,10	1,02	0,11	1,73	0,11
<i>Il10rb</i>	1,00	0,11	0,91	0,10	0,95	0,09	0,94	0,10	1,05	0,11
<i>Il11</i>	1,00	0,11	5,30	0,11	1,98	0,13	1,56	0,11	1,82	0,11
<i>Il13ra1</i>	1,00	0,11	1,73	0,11	1,07	0,11	1,48	0,12	1,10	0,11
<i>Il15</i>	1,00	0,12	3,06	0,13	1,05	0,11	1,33	0,12	1,16	0,13
<i>Il16</i>	1,00	0,12	0,37	0,11	0,57	0,12	0,48	0,11	1,00	0,10
<i>Il17b</i>	1,00	0,13	0,76	0,11	1,48	0,11	0,73	0,11	0,79	0,12
<i>Il18</i>	1,00	0,10	0,77	0,11	0,55	0,13	1,02	0,12	1,00	0,09
<i>Il1f6</i>	1,00	0,11	1,34	0,12	0,76	0,12	2,22	0,11	2,08	0,12
<i>Il1f8</i>	1,00	0,13	0,92	0,12	0,56	0,12	2,29	0,12	1,35	0,11
<i>Il2rb</i>	1,00	0,12	0,90	0,11	0,94	0,11	1,20	0,12	5,38	0,10
<i>Il2rg</i>	1,00	0,12	0,68	0,13	0,79	0,13	1,18	0,12	2,69	0,10
<i>Il3</i>	1,00	0,11	0,94	0,13	11,84	0,12	1,18	0,12	1,48	0,11
<i>Il4</i>	1,00	0,13	0,61	0,13	3,57	0,11	0,58	0,13	0,94	0,12
<i>Il5ra</i>	1,00	0,12	0,21	0,12	0,61	0,11	0,89	0,12	0,72	0,09
<i>Il6ra</i>	1,00	0,13	0,84	0,11	0,74	0,13	0,77	0,11	1,17	0,11
<i>Il6st</i>	1,00	0,15	0,48	0,13	0,90	0,13	0,73	0,11	0,92	0,13
<i>Itgam</i>	1,00	0,12	0,47	0,11	0,28	0,11	0,38	0,10	0,41	0,11
<i>Itgb2</i>	1,00	0,11	1,25	0,11	0,69	0,11	0,57	0,11	1,08	0,11
<i>Lta</i>	1,00	0,12	0,22	0,12	2,93	0,13	1,17	0,13	5,57	0,11
<i>Ltb</i>	1,00	0,12	0,94	0,11	0,95	0,11	1,03	0,11	2,77	0,11
<i>Aimp1</i>	1,00	0,13	2,83	0,10	2,34	0,12	1,44	0,10	2,19	0,10
<i>Spp1</i>	1,00	0,13	4,37	0,16	0,92	0,16	0,86	0,15	1,31	0,15
<i>Tgfb1</i>	1,00	0,13	0,54	0,11	0,41	0,11	0,57	0,11	0,55	0,11
<i>Tnf</i>	1,00	0,11	7,22	0,12	1,70	0,11	2,10	0,12	3,14	0,12
<i>Tnfrsf1a</i>	1,00	0,12	3,39	0,12	2,89	0,11	1,78	0,13	3,14	0,12
<i>Tnfrsf1b</i>	1,00	0,15	3,24	0,13	1,40	0,13	1,52	0,11	2,58	0,11
<i>Cd40lg</i>	1,00	0,12	0,74	0,11	2,66	0,13	1,79	0,12	6,16	0,12
<i>Xcr1</i>	1,00	0,12	0,64	0,12	0,82	0,13	2,12	0,11	3,24	0,11

Tabela Suplementar 2. Expressão gênica avaliada pelo RT-PCR *array* para citocinas e receptores envolvidos na inflamação, aos 7, 14, 21 e 28 dias após contaminação dos canais radiculares de molares de camundongos *knockout* para a enzima 5-lipoxigenase (129-Alox5^{-/-}).

Gene	129-Alox5 ^{-/-}									
	Hígido		Lesão (7 dias)		Lesão (14 dias)		Lesão (21 dias)		Lesão (28 dias)	
	Expressão Relativa	Desvio-padrão	Expressão Relativa	Desvio-padrão	Expressão Relativa	Desvio-padrão	Expressão Relativa	Desvio-padrão	Expressão Relativa	Desvio-padrão
<i>Abcf1</i>	1,00	0,11	1,55	0,10	1,50	0,11	1,44	0,11	2,38	0,10
<i>Bl6</i>	1,00	0,13	0,74	0,12	1,03	0,12	0,95	0,11	1,14	0,13
<i>C3</i>	1,00	0,09	0,85	0,11	0,93	0,11	0,99	0,13	0,68	0,11
<i>Casp1</i>	1,00	0,12	0,70	0,11	0,92	0,10	1,95	0,10	0,67	0,12
<i>Ccl11</i>	1,00	0,11	1,08	0,12	1,41	0,11	1,08	0,15	1,27	0,13
<i>Ccl19</i>	1,00	0,11	1,39	0,10	2,00	0,11	1,75	0,13	2,85	0,11
<i>Ccl2</i>	1,00	0,11	18,80	0,13	5,17	0,11	8,62	0,09	3,55	0,12
<i>Ccl22</i>	1,00	0,10	5,09	0,11	1,80	0,11	2,04	0,11	2,44	0,13
<i>Ccl24</i>	1,00	0,10	0,41	0,12	0,40	0,11	0,48	0,13	0,77	0,11
<i>Ccl7</i>	1,00	0,11	7,50	0,12	2,60	0,11	4,28	0,12	2,42	0,11
<i>Ccr1</i>	1,00	0,11	5,45	0,11	0,99	0,10	2,02	0,11	0,87	0,13
<i>Ccr2</i>	1,00	0,12	0,80	0,13	0,75	0,13	1,05	0,11	0,68	0,13
<i>Ccr3</i>	1,00	0,11	1,52	0,11	0,70	0,11	0,81	0,12	0,45	0,12
<i>Ccr4</i>	1,00	0,11	0,37	0,10	1,83	0,12	0,26	0,11	1,26	0,11
<i>Ccr5</i>	1,00	0,11	2,62	0,12	1,09	0,10	1,63	0,11	1,34	0,11
<i>Cxcl1</i>	1,00	0,11	4,24	0,12	1,33	0,11	2,45	0,12	1,61	0,13
<i>Cxcl12</i>	1,00	0,09	0,76	0,11	0,76	0,08	1,18	0,12	0,38	0,09
<i>Pf4</i>	1,00	0,12	0,64	0,11	1,28	0,11	0,57	0,11	0,62	0,12
<i>Cxcr3</i>	1,00	0,11	1,35	0,12	2,27	0,10	1,29	0,10	2,35	0,10
<i>Cxcr10</i>	1,00	0,11	0,45	0,13	0,62	0,12	0,65	0,13	0,53	0,11
<i>Il10ra</i>	1,00	0,11	2,66	0,11	0,98	0,09	1,34	0,11	1,04	0,11
<i>Il10rb</i>	1,00	0,11	1,79	0,11	1,05	0,10	0,90	0,12	1,16	0,09
<i>Il11</i>	1,00	0,11	4,51	0,11	1,56	0,10	0,77	0,13	0,75	0,12
<i>Il13ra1</i>	1,00	0,11	1,66	0,11	1,59	0,09	1,77	0,10	1,14	0,11
<i>Il15</i>	1,00	0,13	2,45	0,11	0,79	0,12	1,28	0,13	0,67	0,13
<i>Il16</i>	1,00	0,11	0,60	0,13	0,77	0,13	0,62	0,11	0,55	0,11
<i>Il17b</i>	1,00	0,12	1,38	0,12	0,93	0,11	0,95	0,11	1,86	0,11
<i>Il18</i>	1,00	0,09	0,68	0,12	0,94	0,11	1,40	0,10	0,46	0,11
<i>Il1f6</i>	1,00	0,11	1,20	0,12	1,95	0,09	4,15	0,08	0,89	0,12
<i>Il1f8</i>	1,00	0,12	0,76	0,12	0,90	0,11	1,71	0,12	0,43	0,13
<i>Il2rb</i>	1,00	0,10	2,50	0,12	2,36	0,09	1,61	0,11	1,60	0,11
<i>Il2rg</i>	1,00	0,11	1,58	0,11	1,55	0,13	1,10	0,11	0,98	0,11
<i>Il3</i>	1,00	0,11	2,10	0,12	1,35	0,11	0,69	0,11	7,03	0,13
<i>Il4</i>	1,00	0,11	1,13	0,13	3,40	0,12	0,91	0,13	2,20	0,13
<i>Il5ra</i>	1,00	0,11	0,69	0,11	0,73	0,11	0,34	0,12	0,28	0,11
<i>Il6ra</i>	1,00	0,10	0,59	0,12	0,90	0,12	0,70	0,11	0,50	0,13
<i>Il6st</i>	1,00	0,11	0,78	0,14	0,93	0,13	0,58	0,15	0,99	0,13
<i>Itgam</i>	1,00	0,10	1,82	0,10	0,64	0,10	1,05	0,12	0,50	0,11
<i>Itgb2</i>	1,00	0,10	2,48	0,12	1,39	0,10	1,81	0,11	1,57	0,11
<i>Lta</i>	1,00	0,11	0,67	0,13	2,10	0,12	0,71	0,12	1,63	0,12
<i>Ltb</i>	1,00	0,10	1,51	0,13	1,90	0,11	1,40	0,11	1,81	0,11
<i>Aimp1</i>	1,00	0,09	1,14	0,11	1,36	0,11	1,13	0,13	1,81	0,11
<i>Spp1</i>	1,00	0,13	2,24	0,16	0,80	0,16	0,66	0,16	0,67	0,14
<i>Tgfb1</i>	1,00	0,09	0,82	0,13	0,69	0,10	0,76	0,10	0,47	0,12
<i>Tnf</i>	1,00	0,11	11,65	0,11	2,14	0,11	2,26	0,11	2,17	0,11
<i>Tnfrsf1a</i>	1,00	0,11	2,41	0,14	2,27	0,11	2,49	0,11	2,26	0,13
<i>Tnfrsf1b</i>	1,00	0,11	5,18	0,13	1,29	0,11	1,33	0,12	0,96	0,13
<i>Cd40lg</i>	1,00	0,12	0,98	0,12	2,06	0,12	0,85	0,11	1,94	0,12
<i>Xcr1</i>	1,00	0,11	0,79	0,13	2,02	0,13	0,68	0,13	2,12	0,13

Anexo A. Folha de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Ribeirão Preto, processo nº 12.1.60.53.8.

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

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 12.1.60.53.8), intitulado "Mecanismos Envolvidos na Modulação da Via 5-Lipoxigenase na Lesão Periapical Experimental Induzida", de autoria de **Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 06.06.2012.

Colaboradores: Lúcia Helena Faccioli;
Fernanda Regina Ribeiro Santos;
Geyson Galo da Silva;
Renato Cônsoli Augustinho

This is to certify that the work (Protocol number 12.1.60.53.8), entitled: "Mecanismos Envolvidos na Modulação da Via 5-Lipoxigenase na Lesão Periapical Experimental Induzida", by **Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva** and , is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, June, 6 2012.

Ribeirão Preto, 15 de junho de 2012.

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

Anexo B. Folha de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Ribeirão Preto, processo nº 13.1.266.53.6.

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

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo 13.1.266.53.6), intitulado "Investigação do papel da enzima ciclooxygenase-2 na reabsorção óssea periapical induzida pelo lipopolissacarídeo bacteriano", de autoria de **Fernanda Regina Ribeiro Santos e Francisco W G. de Paula e Silva**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do **Campus de Ribeirão Preto – USP** foi aprovado em reunião da CEUA de 02/12/2013.

Colaboradores: Lucia Helena Faccioli
 Léa Assed Bezerra da Silva
 Geyson Galo da Silva

This is to certify that the work (Protocol number 13.1.266.53.6), entitled: "Investigação do papel da enzima ciclooxygenase-2 na reabsorção óssea periapical induzida pelo lipopolissacarídeo bacteriano", by **Fernanda Regina Ribeiro Santos and Francisco W G. de Paula e Silva** is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in an ordinary meeting of CEUA, December, 2 2013.

Ribeirão Preto, 03 de Dezembro de 2013.

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan

Secretaria da CEUA
Vanessa Bombonato Garcia

Anexo C. Informações sobre os animais geneticamente modificados *knockout* para enzima 5-Lipoxigenase (129-Alox5^{-/-}) e animais selvagens (129), obtido do The Jackson Laboratory. Fonte: The Jackson Laboratory Mouse Strain Datasheet - 002485. Disponível em <https://www.jax.org/strain/002485>. Acesso em 22/07/2016.

Home > JAX[®] Mice & Services > Find JAX[®] Mice > JAX[®] Mice database

Strain Name: 129-Alox5^{tm1Fun}/J

Stock Number: 002485

Description

The genotypes of the animals provided may not reflect those discussed in the strain description or the mating scheme utilized by The Jackson Laboratory. Please inquire for possible genotypes for this specific strain.

Strain Information

Type Mutant Strain; Targeted Mutation;
Additional information on Genetically Engineered and Mutant Mice.
Visit our online [Nomenclature tutorial](#).

Species laboratory mouse

Generation F?+12pN1
[Generation Definitions](#)

Appearance
white-bellied agouti
Related Genotype: A^w/A^w

Description
Mice homozygous for the Alox5^{tm1Fun} targeted mutation are viable and fertile. In general, homozygous mutant mice are selectively resistant to inflammatory insults. They lethal effects of platelet activating factor but reaction to endotoxin shock is normal. Phorbol ester induced inflammation is normal but arachidonic acid induced inflammation is reduced. Commonly referred to as 5-LO.

Development
This strain was developed in the lab of Dr. Colin Funk at Vanderbilt University School of Medicine.

Control Information

Control
002448 129S1/SvImJ (approximate)

[Considerations for Choosing Controls](#)

Related Strains

☐ Strains carrying Alox5^{tm1Fun} allele
004155 B6.129S2-Alox5^{tm1Fun}/J
002263 B6.129S2-Alox5^{tm1Fun}/J

☐ View Strains carrying Alox5^{tm1Fun} (2 strains)

Additional Web Information

[New 129 Nomenclature Bulletin](#)

Phenotype

Phenotype Information

☐ View Related Disease (OMIM) Terms

☐ Related Disease (OMIM) Terms provided by MGI
- Potential model based on gene homology relationships. Phenotypic similarity to the human disease has not been tested.
Asthma, Susceptibility to (ALOX5)

☐ View Mammalian Phenotype Terms

☐ Mammalian Phenotype Terms provided by MGI
assigned by genotype

The following phenotype information may relate to a genetic background differing from this JAX[®] Mice strain.

Alox5^{tm1Fun}/Alox5^{tm1Fun}
introduction: 129S2/SvPas * C57BL/6

homozygotes display a normal mean arterial pressure and heart rate relative to wild-type (MGI Ref ID J:21372)

hematopoietic system phenotype

normal hematopoietic system phenotype

analysis of cell-surface markers CD3, CD4 and B220 on splenocytes from 4-wk- and 8-wk-old mice revealed no other abnormalities (MGI Ref ID J:21372)

homozygotes show no changes in total blood cell populations or differential cell counts (MGI Ref ID J:21372)

bone marrow analysis revealed no evidence of abnormal precursor cells of any lineage relative to wild-type (MGI Ref ID J:21372)

small spleen

homozygotes show no abnormalities up to 10 months of age under normal physiological conditions; however, their spleen is usually smaller relative to wild-type (MGI Ref ID J:21372)

immune system phenotype

normal immune system phenotype

homozygotes display a normal reaction to endotoxin-induced shock (MGI Ref ID J:21372)

also, homozygotes exhibit a normal reaction to ear inflammation induced by topical application of phorbol myristyl acetate (MGI Ref ID J:21372)

neutrophil recruitment into the peritoneal cavity by a non-specific inflammatory challenge (glycogen) elicits a comparable (large) influx of polymorphonuclear leukocytes in both wild-type and mutant mice (MGI Ref ID J:21372)

abnormal immune system physiology

conscious, unanesthetized homozygotes show resistance to the lethal effects of platelet-activating factor (PAF); they display the same listless behavior as wild-type for the first 20 min but recover quickly (MGI Ref ID J:21372)

mechanically ventilated, anesthetized homozygotes show no signs of broncho-constriction; however, broncho-constriction is observed after methacholine challenge (MGI Ref ID J:21372)

decreased inflammatory response

homozygotes show a significantly reduced reaction to arachidonic acid-induced ear inflammation; administration of leukotrienes rescues this inflammatory phenotype; inflammation is rapid in onset and maximal swelling is reached between 30-60 min (MGI Ref ID J:21372)

homozygotes display a significantly reduced chemotactic infiltration by polymorphonuclear leukocytes following induction of immune complex peritonitis (reverse passive Arthus reaction) (MGI Ref ID J:21372)

in the thioglycollate-elicited peritonitis model, homozygotes only generate about 50% as much peritoneal leukocytosis as wild-type mice at 4.5 h after i.p. thioglycollate challenge; as expected, leukotriene B₄ is absent from the mutant peritoneal fluid (MGI Ref ID J:75374)

the specific arachidonate 5-lipoxygenase inhibitor, zileuton, has no effect on the peripheral white-cell count in mutant mice (MGI Ref ID J:75374)

small spleen

homozygotes show no abnormalities up to 10 months of age under normal physiological conditions; however, their spleen is usually smaller relative to wild-type (MGI Ref ID J:21372)

Alox5^{tm1Fun}/Alox5^{tm1Fun}

B6.Cg-Alox5^{tm1Fun}

immune system phenotype

normal immune system phenotype

homozygotes display no differences in infarct size following induction of focal cerebral ischemia (permanent or transient; 60 min) relative to wild-type (MGI Ref ID J:89266)

Alox5^{tm1Fun}/Alox5^{tm1Fun}

B6.129S2-Alox5^{tm1Fun}/J

adipose tissue phenotype

increased total fat pad weight

increased total fat pad weight (MGI Ref ID J:104825)

homeostasis/metabolism phenotype

increased circulating VLDL cholesterol level

increased plasma VLDL/LDL cholesterol (MGI Ref ID J:104825)

increased circulating leptin level (MGI Ref ID J:104825)

skeleton phenotype

increased bone mineral density

increased bone mineral density (MGI Ref ID J:104825)

immune system phenotype

decreased susceptibility to experimental autoimmune uveoretinitis

upon adoptive transfer of IRBP-20-specific T cells from wild-type B6 donors to wild-type and Alox5-deficient recipients, wild-type mice develop severe clinical uveitis, whereas mutant recipients show only mild and transient clinical disease (MGI Ref ID J:108446)

View Research Applications

Research Applications

This mouse can be used to support research in many areas including:

Alox5^{tm1Fun} related

Immunology, Inflammation and Autoimmunity Research
Inflammation

Metabolism Research
Enzyme Deficiency

Genes & Alleles

Gene & Allele Information

provided by MGI

Allele Symbol	<i>Alox5^{tm1Fun}</i>
Allele Name	targeted mutation 1, Colin Funk
Allele Type	Targeted (knock-out)
Common Name(s)	5-LO KO; 5-LO ⁻ ; 5-LOX K/O; 5-LOX ⁻ ; 5-LO ⁻ ; 5-LOX ⁻ ;
Mutation Made By	Colin Funk, Queen's University
Strain of Origin	129S2/SvPas
ES Cell Line Name	D3H
ES Cell Line Strain	129S2/SvPas
Gene Symbol and Name	<i>Alox5</i> , arachidonate 5-lipoxygenase
Chromosome	6
Gene Common Name(s)	5-LO; 5-LOX; 5-LO ⁻ ; 5-LPG; 5-LX; A1850497; LOG5; LOX5A; expressed sequence A1850497
Molecular Note	Insertion of a neomycin resistance cassette into exon 6 disrupted the Alox5 gene. RT-PCR studies did not detect transcript in resident peritoneal macrophages of homozygous mutant mice. Western blot analysis of resident peritoneal macrophages of homozygous mutant mice did not detect ALOX5 (MGI Ref ID J:21372)

Genotyping

Genotyping Information

Genotyping Protocols

Alox⁵tm ¹²⁹Pu⁺, Standard PCR

Helpful Links

Genotyping resources and troubleshooting

References

References

provided by MGI

Selected Reference(s)

Chen XS; Sheller JR; Johnson EN; Funk CD. 1994. Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene. *Nature* 372(6502): 179-82. [PubMed: 7969451] [MGI Ref ID: J:21372]

Additional References

Emerson MR; LeVine SM. 2004. Experimental allergic encephalomyelitis is exacerbated in mice deficient for 12/15-lipoxygenase or 5-lipoxygenase. *Brain Res* 1021(1): 140-5. [PubMed: 15328042] [MGI Ref ID: J:92011]

Funk CD; Chen XS; Kurre U; Griffin G. 1995. Leukotriene-deficient mice generated by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 23: 145-50. [PubMed: 7732821] [MGI Ref ID: J:26264]

Alox⁵tm ¹²⁹Pu⁺ related

Adamek A; Jung S; Dienesch C; Laser M; Ertl G; Bauersachs J; Frantz S. 2007. Role of 5-lipoxygenase in myocardial ischemia-reperfusion injury in mice. *Eur J Pharmacol* 571(1): 51-4. [PubMed: 17586489] [MGI Ref ID: J:136740]

Bafica A; Scanga CA; Serhan C; Machado F; White S; Sher A; Aliberti J. 2005. Host control of Mycobacterium tuberculosis is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. *J Clin Invest* 115(6): 1601-1606. [PubMed: 15931391] [MGI Ref ID: J:99199]

Baillie MB; Standiford TJ; Laichalk LL; Coffey MJ; Strieter R; Peters-Golden M. 1996. Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from Klebsiella pneumonia in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. *J Immunol* 157(12): 5221-4. [PubMed: 8955166] [MGI Ref ID: J:110715]

Benjamin CF; Canetti C; Cunha FQ; Kunkel SL; Peters-Golden M. 2005. Opposing and hierarchical roles of leukotrienes in local innate immune versus vascular responses in a model of sepsis. *J Immunol* 174(3): 1616-20. [PubMed: 15661924] [MGI Ref ID: J:96404]

Blaho VA; Zhang Y; Hughes-Hanks JM; Brown CR. 2011. 5-Lipoxygenase-Deficient Mice Infected with Borrelia burgdorferi Develop Persistent Arthritis. *J Immunol* 186(5): 3076-84. [PubMed: 21270404] [MGI Ref ID: J:169390]

Canetti C; Aronoff DM; Choe M; Flamand N; Wettlaufer S; Toews GB; Chen GH; Peters-Golden M. 2006. Differential regulation by leukotrienes and calcium of Fc gamma receptor-induced phagocytosis and Syk activation in dendritic cells versus macrophages. *J Leukoc Biol* 79(6): 1234-41. [PubMed: 16574771] [MGI Ref ID: J:109680]

Cao RY; Adams MA; Habenicht AJ; Funk CD. 2007. Angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm occurs independently of the 5-lipoxygenase pathway in apolipoprotein E-deficient mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 84(1-2): 34-42. [PubMed: 17643886] [MGI Ref ID: J:129321]

Chen Y; Hu Y; Zhang H; Peng C; Li S. 2009. Loss of the Alox5 gene impairs leukemia stem cells and prevents chronic myeloid leukemia. *Nat Genet* 41(7): 783-92. [PubMed: 19503090] [MGI Ref ID: J:151439]

Chen Y; Sullivan C; Peng C; Shan Y; Hu Y; Li D; Li S. 2011. A tumor suppressor function of the Msr1 gene in leukemia stem cells of chronic myeloid leukemia. *Blood* 118(2): 390-400. [PubMed: 21596859] [MGI Ref ID: J:174876]

Chen Y; Zhu J; Lum PY; Yang X; Pinto S; MacNeil DJ; Zhang C; Lamb J; Edwards S; Sieberts SK; Leonardson A; Castellini LW; Wang S; Champy MF; Zhang B; Emilsson V; Doss S; Ghazalpour A; Horvath S; Drake TA; Lusis AJ; Schadt EE. 2008. Variations in DNA elucidate molecular networks that cause disease. *Nature* 452(7186): 429-35. [PubMed: 18344982] [MGI Ref ID: J:134171]

Cheon EC; Khazaei K; Khan MW; Strouch MJ; Krantz SB; Phillips J; Blatner NR; Hix LM; Zhang M; Dennis KL; Salabat MR; Heiferman M; Grippo PJ; Murshel HG; Gounaris E; Bentzen DJ. 2011. Mast Cell 5-Lipoxygenase Activity Promotes Intestinal Polyposis in APC(Delta)468 Mice. *Cancer Res* 71(5): 1627-36. [PubMed: 21216893] [MGI Ref ID: J:169312]

Chou VP; Holman TR; Manning-Bog AB. 2013. Differential contribution of lipoxygenase isozymes to nigrostriatal vulnerability. *Neuroscience* 228: 73-82. [PubMed: 23079635] [MGI Ref ID: J:194022]

Collin M; Rossi A; Cuzzocrea S; Patel NS; Di Paola R; Hadley J; Collino M; Sautebin L; Thiemermann C. 2004. Reduction of the multiple organ injury and dysfunction caused by endotoxemia in 5-lipoxygenase knockout mice and by the 5-lipoxygenase inhibitor zileuton. *J Leukoc Biol* 76(5): 961-70. [PubMed: 15328337] [MGI Ref ID: J:93517]

Cuzzocrea S; Rossi A; Serrano I; Di Paola R; Dugo L; Genovese T; Britti D; Sciarra G; De Sarro A; Caputi AP; Sautebin L. 2003. 5-lipoxygenase knockout mice exhibit a resistance to acute pancreatitis induced by cerulein. *Immunology* 110(1): 120-30. [PubMed: 12941149] [MGI Ref ID: J:113639]

Cuzzocrea S; Rossi A; Serrano I; Mazzon E; Di Paola R; Dugo L; Genovese T; Calabro B; Caputi AP; Sautebin L. 2003. 5-Lipoxygenase knockout mice exhibit a resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *J Leukoc Biol* 73(6): 739-46. [PubMed: 12773506] [MGI Ref ID: J:120440]

DiMeo D; Tian J; Zhang J; Nanshima S; Berg DJ. 2008. Increased interleukin-10 production and Th2 skewing in the absence of 5-lipoxygenase. *Immunology* 123(2): 250-62. [PubMed: 17894798] [MGI Ref ID: J:134808]

Emerson MR; LeVine SM. 2004. Experimental allergic encephalomyelitis is exacerbated in mice deficient for 12/15-lipoxygenase or 5-lipoxygenase. *Brain Res* 1021(1): 140-5. [PubMed: 15328042] [MGI Ref ID: J:92011]

Esper L; Roman-Campos D; Lima A; Brant F; Castro LL; Barroso A; Araujo RR; Vieira LQ; Mukherjee S; Gomes ER; Rocha NN; Ramos IP; Lisanti MP; Campos CF; Arantes RM; Guatimosim S; Weiss LM; Cruz JS; Tanowitz HB; Teixeira MM; Machado FS. 2012. Role of SOCS2 in Modulating Heart Damage and Function in a Murine Model of Acute Chagas Disease. *Am J Pathol* 181(1): 130-40. [PubMed: 22558486] [MGI Ref ID: J:185514]

Firuzi O; Zhuo J; Chinnici CM; Wisniewski T; Pratico D. 2008. 5-Lipoxygenase gene disruption reduces amyloid-beta pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J* 22(4): 1169-78. [PubMed: 17998412] [MGI Ref ID: J:134897]

Genovese T; Mazzon E; Rossi A; Di Paola R; Cannavo G; Mula C; Crisafulli C; Bramanti P; Sautebin L; Cuzzocrea S. 2005. Involvement of 5-lipoxygenase in spinal cord injury. *J Neuroimmunol* 166(1-2): 55-64. [PubMed: 16019083] [MGI Ref ID: J:106400]

Ghazalpour A; Wang X; Lusis AJ; Mehrabian M. 2006. Complex inheritance of the 5-lipoxygenase locus influencing atherosclerosis in mice. *Genetics* 173(2): 943-51. [PubMed: 16624897] [MGI Ref ID: J:109792]

Gubitosi-Klug RA; Talahalli R; Du Y; Nadler JL; Kern TS. 2008. 5-Lipoxygenase, but not 12/15-lipoxygenase, contributes to degeneration of retinal capillaries in a mouse model of diabetic retinopathy. *Diabetes* 57(5): 1387-93. [PubMed: 18346986] [MGI Ref ID: J:136092]

Guerrero AT; Verri WA Jr; Cunha TM; Silva TA; Schivo IR; Dal-Secco D; Canetti C; Rocha FA; Parada CA; Cunha FQ; Ferreira SH. 2008. Involvement of LTB4 in zymosan-induced

joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE₂. *J Leukoc Biol* 83(1):122-30. [PubMed: 17913976] [MGI Ref ID J:130113]

Hoggatt J; Mohammad KS; Singh P; Hoggatt AF; Chitteti BR; Speth JM; Hu P; Poteat BA; Stiller KN; Ferraro F; Silberstein L; Wong FK; Farag SS; Czader M; Milne GL; Breyer RM; Serezani CH; Scadden DT; Guise TA; Strou EF; Pelus LM. 2013. Differential stem- and progenitor-cell trafficking by prostaglandin E₂. *Nature* 495(7441):365-9. [PubMed: 23485965] [MGI Ref ID J:195129]

Ichinose F; Zapol WM; Sapirstein A; Ullrich R; Tager AM; Coggins K; Jones R; Bloch KD. 2001. Attenuation of hypoxic pulmonary vasoconstriction by endotoxemia requires 5-lipoxygenase in mice. *Circ Res* 88(8):832-8. [PubMed: 11325876] [MGI Ref ID J:115401]

Irvin CG; Tu YP; Sheller JR; Funk CD. 1997. 5-Lipoxygenase products are necessary for ovalbumin-induced airway responsiveness in mice. *Am J Physiol* 272(6 Pt 1):L1053-8. [PubMed: 9227503] [MGI Ref ID J:113047]

Jiang W; Hall SR; Moos MP; Cao RY; Ishii S; Ogumiyankin KO; Melo LG; Funk CD. 2008. Endothelial Cysteinyl Leukotriene 2 Receptor Expression Mediates Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Am J Pathol* 172(3):592-602. [PubMed: 18276782] [MGI Ref ID J:132275]

Kitagawa K; Matsumoto M; Hori M. 2004. Cerebral ischemia in 5-lipoxygenase knockout mice. *Brain Res* 1004(1-2):198-202. [PubMed: 15033436] [MGI Ref ID J:189266]

Lammemann T; Afonso PV; Angermann BR; Wang JM; Kastenmüller W; Parent CA; Germann RN. 2013. Neutrophil swarms require LTB₄ and integrins at sites of cell death in vivo. *Nature* 498(7454):371-5. [PubMed: 23708669] [MGI Ref ID J:118733]

Le P; Kawai M; Bornstein S; DeMambro VE; Horowitz MC; Rosen CJ. 2012. A high-fat diet induces bone loss in mice lacking the Alox5 gene. *Endocrinology* 153(1):6-16. [PubMed: 22120209] [MGI Ref ID J:181777]

Leedom AJ; Sullivan AB; Dong B; Lau D; Gronert K. 2010. Endogenous LXA₄ circuits are determinants of pathological angiogenesis in response to chronic injury. *Am J Pathol* 176(1):74-84. [PubMed: 20008145] [MGI Ref ID J:115647]

Lemos HP; Grespan R; Vieira SM; Cunha TM; Venti WA Jr; Fernandes KS; Souto FO; McInnes IB; Ferreira SH; Liew FY; Cunha FQ. 2009. Prostaglandin mediates IL-23/IL-17-induced neutrophil migration in inflammation by inhibiting IL-12 and IFN-gamma production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(14):5954-9. [PubMed: 19289816] [MGI Ref ID J:147573]

Liao T; Ke Y; Shao WH; Haribabu B; Kaplan HJ; Sun D; Shao H. 2006. Blockade of the interaction of leukotriene b₄ with its receptor prevents development of autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(4):1543-9. [PubMed: 16565390] [MGI Ref ID J:108446]

Machado ER; Ueta MT; Lourenco EV; Anibal FF; Sorgi CA; Soares EG; Roque-Barreira MC; Medeiros AI; Faccioli LH. 2005. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. *J Immunol* 175(6):3892-9. [PubMed: 16148135] [MGI Ref ID J:116694]

Mancuso P; Lewis C; Serezani CH; Goel D; Peters-Golden M. 2010. Intrapulmonary administration of leukotriene B₄ enhances pulmonary host defense against pneumococcal pneumonia. *Infect Immun* 78(5):2264-71. [PubMed: 20231413] [MGI Ref ID J:159876]

McKee AS; Munks MW; MacLeod MK; Fleenor CJ; Van Rooijen N; Kappler JW; Marrack P. 2009. Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. *J Immunol* 183(7):4403-14. [PubMed: 19734227] [MGI Ref ID J:152787]

Medeiros AI; Sa-Nunes A; Turato WM; Secatto A; Frantz FG; Sorgi CA; Serezani CH; Depe GS Jr; Faccioli LH. 2008. Leukotrienes are potent adjuvant during fungal infection: effects on memory T cells. *J Immunol* 181(2):8544-51. [PubMed: 19092272] [MGI Ref ID J:142061]

Mehrabian M; Allayee H; Stockton J; Lum PY; Drake TA; Castellani LW; Suh M; Amour C; Edwards S; Lamb J; Lusa AJ; Schadt EE. 2005. Integrating genotypic and expression data in a segregating mouse population to identify 5-lipoxygenase as a susceptibility gene for obesity and bone traits. *Nat Genet* 37(11):1224-33. [PubMed: 16200066] [MGI Ref ID J:104825]

Mehrabian M; Allayee H; Wong J; Shi W; Wang XP; Shaposhnik Z; Funk CD; Lusa AJ. 2002. Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice. *Circ Res* 91(2):120-6. [PubMed: 12142344] [MGI Ref ID J:109703]

Mehrabian M; Schulthess FT; Nebahacova M; Castellani LW; Zhou Z; Hartala J; Oberholzer J; Lusa AJ; Maedler K; Allayee H. 2008. Identification of ALOX5 as a gene regulating adiposity and pancreatic function. *Diabetologia* 51(6):976-88. [PubMed: 18421434] [MGI Ref ID J:137920]

Monteiro AP; Pinheiro CS; Luna-Gomes T; Alves LR; Maya-Monteiro CM; Porto BN; Banja-Fidalgo C; Benjamin CF; Peters-Golden M; Bandeira-Melo C; Bozza MT; Canetti C. 2011. Leukotriene b₄ mediates neutrophil migration induced by heme. *J Immunol* 186(11):6562-7. [PubMed: 21536805] [MGI Ref ID J:173172]

Nagashima T; Ichimiya S; Kikuchi T; Saito Y; Matsumiya H; Ara S; Koshida S; Zhang J; Hatate C; Tonooka A; Kubo T; Ye RC; Hirose B; Shirasaki H; Izumi T; Takami T; Hirai T; Sato N. 2011. Arachidonate 5-lipoxygenase establishes adaptive humoral immunity by controlling primary B cells and their cognate T-cell help. *Am J Pathol* 178(1):222-32. [PubMed: 21224055] [MGI Ref ID J:116889]

Narushima S; DiMeo D; Tian J; Zhang J; Liu D; Berg DJ. 2008. 5-Lipoxygenase-derived lipid mediators are not required for the development of NSAID-induced inflammatory bowel disease in IL-10^{-/-} mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294(2):G477-88. [PubMed: 18048476] [MGI Ref ID J:132202]

Obrosova IG; Stavnichuk R; Drel VR; Shevalye H; Varenuk I; Nadler JL; Schmidt RE. 2010. Different roles of 12/15-lipoxygenase in diabetic large and small fiber peripheral and autonomic neuropathies. *Am J Pathol* 177(3):1436-47. [PubMed: 20724598] [MGI Ref ID J:163914]

Pai LA; Maya-Monteiro CM; Bandeira-Melo C; Silva PM; El-Chelikh MC; Teodoro AJ; Borjevic R; Perez SA; Bozza PT. 2010. Interplay of cysteinyl leukotrienes and TGF-beta in the activation of hepatic stellate cells from *Schistosoma mansoni* granulomas. *Biochim Biophys Acta* 1804(12):1341-8. [PubMed: 20817008] [MGI Ref ID J:170248]

Peebles RS Jr; Hashimoto K; Sheller JR; Moore ML; Morrow JD; Ji S; Elias JA; Goleniewska K; O'neal J; Mitchell DB; Graham BS; Zhou W. 2005. Allergen-induced airway hyperresponsiveness mediated by cyclooxygenase inhibition is not dependent on 5-lipoxygenase or IL-5, but is IL-13 dependent. *J Immunol* 175(12):8253-9. [PubMed: 16339565] [MGI Ref ID J:122257]

Peng C; Chen Y; Shan Y; Zhang H; Guo Z; Li D; Li S. 2012. LSK derived LSK⁺ cells have a high apoptotic rate related to survival regulation of hematopoietic and leukemic stem cells. *PLoS One* 7(6):e38614. [PubMed: 22675376] [MGI Ref ID J:187845]

Peters-Golden M; Badie M; Marshall T; Wilke C; Phan SH; Toews GB; Moore BB. 2002. Protection from pulmonary fibrosis in leukotriene-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 165(2):229-35. [PubMed: 11790660] [MGI Ref ID J:103107]

Poockel D; Zernski Berry KA; Murphy RC; Funk CD. 2009. Dual 12/15- and 5-lipoxygenase deficiency in macrophages alters arachidonic acid metabolism and attenuates peritonitis and atherosclerosis in apoe knock-out mice. *J Biol Chem* 284(31):21077-89. [PubMed: 19509298] [MGI Ref ID J:153174]

Queto T; Gaspar-Elsas M; Masid-de-Brito D; Vasconcelos ZF; Ferraris FK; Penido C; Cunha FQ; Kanaoka Y; Lam BK; Xavier-Elsas P. 2010. Cysteinyl-leukotriene type 1 receptors transduce a critical signal for the up-regulation of eosinophilopoiesis by interleukin-13 and eotaxin in murine bone marrow. *J Leukoc Biol* 87(5):885-93. [PubMed: 20219953] [MGI Ref ID J:160350]

Rossi A; Acquaviva AM; Iuliano F; Di Paola R; Cuzzocrea S; Sautebin L. 2005. Up-regulation of prostaglandin biosynthesis by leukotriene C₄ in elicited mice peritoneal macrophages activated with lipopolysaccharide/interferon-gamma. *J Leukoc Biol* 78(4):985-91. [PubMed: 16046533] [MGI Ref ID J:101535]

Sadik CD; Kim ND; Iwakura Y; Luster AD. 2012. Neutrophils orchestrate their own recruitment in murine arthritis through C5aR and P-gammaR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(46):E3777-85. [PubMed: 23112187] [MGI Ref ID J:191734]

- Sapleha P; Stahl A; Chen J; Seaward MR; Willett KL; Krah NM; Dennison RJ; Connor KM; Adelman CM; Lidican E; Carughi A; Perelman D; Kanaoka Y; Sangiovanni JP; Gronert K; Smith LE. 2011. 5-Lipoxygenase metabolite 4-HDHA is a mediator of the antiangiogenic effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Sci Transl Med* 3(69):69a12. [PubMed: 21307302] [MGI Ref ID J:171000]
- Secatto A; Rodrigues LC; Serevani CH; Ramos SG; Dias-Baruffi M; Faccioli LH; Medeiros AI. 2012. 5-Lipoxygenase deficiency impairs innate and adaptive immune responses during fungal infection. *PLoS One* 7(3):e31701. [PubMed: 22448213] [MGI Ref ID J:187034]
- Segal BH; Kuhns DB; Ding L; Gallin JI; Holland SM. 2002. Thiolglycollate peritonitis in mice lacking C5, 5-lipoxygenase, or p47(phox): complement, leukotrienes, and reactive oxidants in acute inflammation. *J Leukoc Biol* 71(3):410-6. [PubMed: 11867678] [MGI Ref ID J:75371]
- Serevani CH; Aronoff DM; Jancar S; Mancuso P; Peters-Golden M. 2005. Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *Klebsiella pneumoniae* through the activation of NADPH oxidase. *Blood* 106(3):1067-75. [PubMed: 15718414] [MGI Ref ID J:117300]
- Serevani CH; Aronoff DM; Jancar S; Peters-Golden M. 2005. Leukotriene B4 mediates p47phox phosphorylation and membrane translocation in polyunsaturated fatty acid-stimulated neutrophils. *J Leukoc Biol* 78(4):976-84. [PubMed: 16006533] [MGI Ref ID J:101536]
- Serevani CH; Kane S; Collins L; Morato-Marques M; Osterholzer JJ; Peters-Golden M. 2012. Macrophage dectin-1 expression is controlled by leukotriene B4 via a GM-CSF/PU.1 axis. *J Immunol* 189(2):906-15. [PubMed: 22696442] [MGI Ref ID J:189546]
- Serevani CH; Lewis C; Jancar S; Peters-Golden M. 2011. Leukotriene B4 amplifies NF-kappaB activation in mouse macrophages by reducing SOCS1 inhibition of MyD88 expression. *J Clin Invest* 121(2):671-82. [PubMed: 21206089] [MGI Ref ID J:171834]
- Serevani CH; Perrella JH; Russo M; Peters-Golden M; Jancar S. 2006. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. *J Immunol* 177(5):3201-8. [PubMed: 16920959] [MGI Ref ID J:139527]
- Shim YM; Zhu Z; Zheng T; Lee CG; Homer RJ; Ma B; Elias JA. 2006. Role of 5-lipoxygenase in IL-13-induced pulmonary inflammation and remodeling. *J Immunol* 177(3):1918-24. [PubMed: 16849503] [MGI Ref ID J:138359]
- Soares EM; Mason KL; Rogers LM; Serevani CH; Faccioli LH; Aronoff DM. 2013. Leukotriene B4 Enhances Innate Immune Defense against the Puerperal Sepsis Agent *Streptococcus pyogenes*. *J Immunol* 190(4):1614-22. [PubMed: 23325886] [MGI Ref ID J:193406]
- Sorgi CA; Secatto A; Fontanari C; Turato WM; Belanger C; de Medeiros AI; Kashima S; Marleau S; Covas DT; Bozza PT; Faccioli LH. 2009. Histoplasma capsulatum cell wall (beta)-glucan induces lipid body formation through CD18, TLR2, and dectin-1 receptors: correlation with leukotriene B4 generation and role in HIV-1 infection. *J Immunol* 182(7):4025-35. [PubMed: 19299700] [MGI Ref ID J:147134]
- Swindle EJ; Coleman JW; DeLeo FR; Metcalfe DD. 2007. Fc epsilon RI- and Fc gamma receptor-mediated production of reactive oxygen species by mast cells is lipoxygenase- and cyclooxygenase-dependent and NADPH oxidase-independent. *J Immunol* 179(10):7059-71. [PubMed: 17982097] [MGI Ref ID J:153954]
- Uz T; Dimitrijevic N; Imbesi M; Manev H; Manev R. 2008. Effects of MK-886, a 5-lipoxygenase activating protein (FLAP) inhibitor, and 5-lipoxygenase deficiency on the forced swimming behavior of mice. *Neurosci Lett* 436(2):169-72. [PubMed: 18403121] [MGI Ref ID J:136638]
- Vannella KM; McMillan TR; Charbeneau RP; Wilke CA; Thomas PE; Toews GB; Peters-Golden M; Moore BB. 2007. Cysteinyl leukotrienes are autocrine and paracrine regulators of fibrocyte function. *J Immunol* 179(11):7683-90. [PubMed: 18025235] [MGI Ref ID J:154902]
- Verri WA Jr; Cunha TM; Ferreira SH; Wei X; Leung BP; Fraser A; McInnes IB; Liew FY; Cunha FQ. 2007. IL-15 mediates antigen-induced neutrophil migration by triggering IL-18 production. *Eur J Immunol* 37(12):3373-80. [PubMed: 17979156] [MGI Ref ID J:128427]
- Wang SS; Martin LJ; Schadt EE; Meng H; Wang X; Zhao W; Ingram-Drake L; Nebouchava M; Mehrabian M; Drake TA; Lusis AJ. 2009. Disruption of the aortic elastic lamina and medial calcification share genetic determinants in mice. *Circ Cardiovasc Genet* 2(6):573-82. [PubMed: 20031637] [MGI Ref ID J:182797]
- Zhu L; Maruvada R; Sapirstein A; Malik KU; Peters-Golden M; Kim KS. 2010. Arachidonic Acid Metabolism Regulates *Escherichia coli* Penetration of the Blood-Brain Barrier. *Infect Immun* 78(10):4302-10. [PubMed: 20666828] [MGI Ref ID J:164236]

Health & husbandry

The genotypes of the animals provided may not reflect those discussed in the strain description or the mating scheme utilized by The Jackson Laboratory prior to cryopreservation. Please inquire for possible genotypes for this specific strain.

Health & Colony Maintenance Information

Animal Health Reports

Production of mice from cryopreserved embryos or sperm occurs in a maximum barrier room, G000.

Colony Maintenance

Breeding & Husbandry Homozygous mice are viable and fertile. This strain is maintained by homozygous matings. Expected coat color from breeding: White Bellied Agouti

Diet Information LabDiet® 5K52/5K67

Pricing and Purchasing

Pricing, Supply Level & Notes, Controls

Pricing for **USA, Canada and Mexico** shipping destinations

Cryopreserved

Cryopreserved Mice - Ready for Recovery

Price (US Dollars \$)

Animals Provided

At least two mice that carry the mutation (if it is a mutant strain) will be provided. Their genotypes may not reflect those discussed in the strain description. Please inquire for possible genotype and see additional details below.

Standard Supply

Cryopreserved. Ready for recovery. Please refer to pricing and supply notes on the strain data sheet for further information.

Supply Notes

Cryorecovery - Standard.**Progeny testing is not required.**

The average number of mice provided from recovery of our cryopreserved strains is 10. The total number of animals provided, their gender and genotype will vary. We will fulfill your order by providing at least two pair of mice, at least one animal of each pair carrying the mutation of interest. Please inquire if larger numbers of animals with specific genotype and genders are needed. Animals typically ship between 11 and 14 weeks from the date of your order. If a second cryorecovery is needed in order to provide the minimum number of animals, animals will ship within 25 weeks. **IMPORTANT NOTE:** The genotypes of animals provided may not reflect the mating scheme utilized by The Jackson Laboratory prior to cryopreservation, or that discussed in the strain description. Please inquire about possible genotypes which will be recovered for this specific strain. The Jackson Laboratory cannot guarantee the reproductive success of mice shipped to your facility. If the mice are lost after the first three days (post-arrival) or do not produce progeny at your facility, a new order and fee will be necessary.

Cryorecovery to establish a Dedicated Supply for greater quantities of mice

Mice recovered can be used to establish a dedicated colony to contractually supply you mice according to your requirements. Price by quotation. For more information on Dedicated Supply, please contact JAX® Services, Tel: 1-800-422-6423 (from U.S.A., Canada or Puerto Rico only) or 1-207-288-5845 (from any location).

Pricing for International shipping destinations**Cryopreserved****Cryopreserved Mice - Ready for Recovery****Animals Provided**

At least two mice that carry the mutation (if it is a mutant strain) will be provided. Their genotypes may not reflect those discussed in the strain description. Please inquire for possible genotypes and see additional details below.

Standard Supply

Cryopreserved. Ready for recovery. Please refer to pricing and supply notes on the strain data sheet for further information.

Supply Notes**Cryorecovery - Standard.****Progeny testing is not required.**

The average number of mice provided from recovery of our cryopreserved strains is 10. The total number of animals provided, their gender and genotype will vary. We will fulfill your order by providing at least two pair of mice, at least one animal of each pair carrying the mutation of interest. Please inquire if larger numbers of animals with specific genotype and genders are needed. Animals typically ship between 11 and 14 weeks from the date of your order. If a second cryorecovery is needed in order to provide the minimum number of animals, animals will ship within 25 weeks. **IMPORTANT NOTE:** The genotypes of animals provided may not reflect the mating scheme utilized by The Jackson Laboratory prior to cryopreservation, or that discussed in the strain description. Please inquire about possible genotypes which will be recovered for this specific strain. The Jackson Laboratory cannot guarantee the reproductive success of mice shipped to your facility. If the mice are lost after the first three days (post-arrival) or do not produce progeny at your facility, a new order and fee will be necessary.

Cryorecovery to establish a Dedicated Supply for greater quantities of mice

Mice recovered can be used to establish a dedicated colony to contractually supply you mice according to your requirements. Price by quotation. For more information on Dedicated Supply, please contact JAX® Services, Tel: 1-800-422-6423 (from U.S.A., Canada or Puerto Rico only) or 1-207-288-5845 (from any location).

Standard Supply

Cryopreserved. Ready for recovery. Please refer to pricing and supply notes on the strain data sheet for further information.

General Supply Notes

Genomic DNA is available for this strain from the Mouse DNA Resource.

Control Information**Control**

002448129S1/S1mJ (approximate)

Considerations for Choosing Controls

Control Pricing Information for Genetically Engineered Mutant Strains.

Payment Terms and Conditions

Terms are granted by individual review and stated on the customer invoice(s) and account statement. These transactions are payable in U.S. currency within the granted terms. Payment for services, products, shipping containers, and shipping costs that are rendered are expected within the payment terms indicated on the invoice or stated by contract. Invoices and account balances in arrears of stated terms may result in The Jackson Laboratory pursuing collection activities including but not limited to outside agencies and court filings.

See *Terms of Use* tab for General Terms and Conditions

The Jackson Laboratory's Genotype Promise

The Jackson Laboratory has rigorous genetic quality control and mutant gene genotyping programs to ensure the genetic background of JAX® Mice strains as well as the genotypes of strains with identified molecular mutations. JAX® Mice strains are only made available to researchers after meeting our standards. However, the phenotype of each strain may not be fully characterized and/or captured in the strain data sheets. Therefore, we cannot guarantee a strain's phenotype will meet all expectations. To ensure that JAX® Mice will meet the needs of individual research projects or when requesting a strain that is new to your research, we suggest ordering and performing tests on a small number of mice to determine suitability for your particular project.

Ordering Information

JAX® Mice

Surgical and Preconditioning Services

JAX® Services

Customer Services and Support

Tel: 1-800-422-6423 or 1-207-288-5845

Fax: 1-207-288-6190

Technical Support Email Form

Terms of Use

Terms of Use

General Terms and Conditions

Contact information

General inquiries regarding Terms of Use

Contracts Administration

phone: 207-288-6470

JAX[®] Mice, Products & Services Conditions of Use

"MICE" means mouse strains, their progeny derived by inbreeding or crossbreeding, unmodified derivatives from mouse strains or their progeny supplied by The Jackson Laboratory ("JACKSON"). "PRODUCTS" means biological materials supplied by JACKSON, and their derivatives. "RECIPIENT" means each recipient of MICE, PRODUCTS, or services provided by JACKSON including each institution, its employees and other researchers under its control. MICE or PRODUCTS shall not be: (i) used for any purpose other than the internal research, (ii) sold or otherwise provided to any third party for any use, or (iii) provided to any agent or other third party to provide breeding or other services. Acceptance of MICE or PRODUCTS from JACKSON shall be deemed as agreement by RECIPIENT to these conditions, and departure from these conditions requires JACKSON's prior written authorization.

No Warranty

MICE, PRODUCTS AND SERVICES ARE PROVIDED "AS IS". JACKSON EXTENDS NO WARRANTIES OF ANY KIND, EITHER EXPRESS, IMPLIED, OR STATUTORY, WITH RESPECT TO MICE, PRODUCTS OR SERVICES, INCLUDING ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR ANY WARRANTY OF NON-INFRINGEMENT OF ANY PATENT, TRADEMARK, OR OTHER INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS.

In case of dissatisfaction for a valid reason and claimed in writing by a purchaser within ninety (90) days of receipt of mice, products or services, JACKSON will, at its option, provide credit or replacement for the mice or product received or the services provided.

No Liability

In no event shall JACKSON, its trustees, directors, officers, employees, and affiliates be liable for any causes of action or damages, including any direct, indirect, special, or consequential damages, arising out of the provision of MICE, PRODUCTS or services, including economic damage or injury to property and lost profits, and including any damage arising from acts or negligence on the part of JACKSON, its agents or employees. Unless prohibited by law, in purchasing or receiving MICE, PRODUCTS or services from JACKSON, purchaser or recipient, or any party claiming by or through them, expressly releases and discharges JACKSON from all such causes of action or damages, and further agrees to defend and indemnify JACKSON from any costs or damages arising out of any third party claims.

MICE and PRODUCTS are to be used in a safe manner and in accordance with all applicable governmental rules and regulations.

The foregoing represents the General Terms and Conditions applicable to JACKSON's MICE, PRODUCTS or services. In addition, special terms and conditions of sale of certain MICE, PRODUCTS or services may be set forth separately in JACKSON web pages, catalogs, price lists, contracts, and/or other documents, and these special terms and conditions shall also govern the sale of these MICE, PRODUCTS and services by JACKSON, and by its licensees and distributors.

Acceptance of delivery of MICE, PRODUCTS or services shall be deemed agreement to these terms and conditions. No purchase order or other document transmitted by purchaser or recipient that may modify the terms and conditions hereof, shall be in any way binding on JACKSON, and instead the terms and conditions set forth herein, including any special terms and conditions set forth separately, shall govern the sale of MICE, PRODUCTS or services by JACKSON.

(6.3)

Anexo D. Tabela contendo o nome e símbolo dos genes avaliados pelo RT-PCR *array* para citocinas e receptores envolvidos na inflamação, assim como as informações sobre o número de acesso nas bases de dados Unigene e GeneBank. Fonte: Inflammatory Cytokines and Receptors RT² Profiler PCR Array. Disponível em <https://www.qiagen.com/br/shop/pcr/primer-sets/rt2-profiler-pcr-arrays>. Acesso em 21/07/2016.

Table 1. National Center for Biotechnology Information (NCBI) of the transcriptome, Bank access number, Symbol and Nomenclature of genes evaluated by qRT-PCR array that encode mouse inflammatory cytokines and receptors

Unigene	GeneBank	Symbol	Nomenclature
Mm.329022	NM_013854	<i>Abcf1</i>	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1
Mm.347398	NM_009744	<i>Bcl6</i>	B-cell leukemia/lymphoma 6
Mm.491799	NM_007551	<i>Cxcr5</i>	Chemokine (C-X-C motif) receptor 5
Mm.19131	NM_009778	<i>C3</i>	Complement component 3
Mm.1051	NM_009807	<i>Casp1</i>	Caspase 1
Mm.1283	NM_011329	<i>Ccl1</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 1
Mm.4686	NM_011330	<i>Ccl11</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 11
Mm.867	NM_011331	<i>Ccl12</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 12
Mm.41988	NM_011332	<i>Ccl17</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 17
Mm.490604	NM_011888	<i>Ccl19</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 19
Mm.290320	NM_011333	<i>Ccl2</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 2
Mm.116739	NM_016960	<i>Ccl20</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 20
Mm.12895	NM_009137	<i>Ccl22</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 22
Mm.31505	NM_019577	<i>Ccl24</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 24
Mm.7275	NM_009138	<i>Ccl25</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 25
Mm.1282	NM_011337	<i>Ccl3</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 3
Mm.244263	NM_013652	<i>Ccl4</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 4
Mm.284248	NM_013653	<i>Ccl5</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 5
Mm.137	NM_009139	<i>Ccl6</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 6
Mm.341574	NM_013654	<i>Ccl7</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 7
Mm.42029	NM_021443	<i>Ccl8</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 8
Mm.416125	NM_011338	<i>Ccl9</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 9
Mm.274927	NM_009912	<i>Ccr1</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 1
Mm.6272	NM_009915	<i>Ccr2</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 2
Mm.57050	NM_009914	<i>Ccr3</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 3
Mm.1337	NM_009916	<i>Ccr4</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 4
Mm.14302	NM_009917	<i>Ccr5</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 5
Mm.8007	NM_009835	<i>Ccr6</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 6
Mm.2932	NM_007719	<i>Ccr7</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 7
Mm.442098	NM_007720	<i>Ccr8</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 8
Mm.442383	NM_009913	<i>Ccr9</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 9
Mm.28767	NM_007768	<i>Crp</i>	C-reactive protein, pentraxin-related
Mm.103711	NM_009142	<i>Cx3cl1</i>	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
Mm.21013	NM_008176	<i>Cxcl1</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
Mm.877	NM_021274	<i>Cxcl10</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
Mm.131723	NM_019494	<i>Cxcl11</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11
Mm.303231	NM_021704	<i>Cxcl12</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12
Mm.10116	NM_018866	<i>Cxcl13</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13
Mm.64326	NM_011339	<i>Cxcl15</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 15
Mm.332490	NM_019932	<i>Pf4</i>	Platelet factor 4
Mm.4660	NM_009141	<i>Cxcl5</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5
Mm.766	NM_008599	<i>Cxcl9</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9

Unigene	GeneBank	Symbol	Nomenclature
Mm.12876	NM_009910	<i>Cxcr3</i>	Chemokine (C-X-C motif) receptor 3
Mm.8021	NM_007721	<i>Ccr10</i>	Chemokine (C-C motif) receptor 10
Mm.240327	NM_008337	<i>Ifng</i>	Interferon gamma
Mm.874	NM_010548	<i>Il10</i>	Interleukin 10
Mm.379327	NM_008348	<i>Il10ra</i>	Interleukin 10 receptor, alpha
Mm.4154	NM_008349	<i>Il10rb</i>	Interleukin 10 receptor, beta
Mm.35814	NM_008350	<i>Il11</i>	Interleukin 11
Mm.1284	NM_008355	<i>Il13</i>	Interleukin 13
Mm.24208	NM_133990	<i>Il13ra1</i>	Interleukin 13 receptor, alpha 1
Mm.490053	NM_008357	<i>Il15</i>	Interleukin 15
Mm.10137	NM_010551	<i>Il16</i>	Interleukin 16
Mm.59313	NM_019508	<i>Il17b</i>	Interleukin 17B
Mm.1410	NM_008360	<i>Il18</i>	Interleukin 18
Mm.15534	NM_010554	<i>Il1a</i>	Interleukin 1 alpha
Mm.222830	NM_008361	<i>Il1b</i>	Interleukin 1 beta
Mm.133095	NM_019450	<i>Il1f6</i>	Interleukin 1 family, member 6
Mm.45901	NM_027163	<i>Il1f8</i>	Interleukin 1 family, member 8
Mm.896	NM_008362	<i>Il1r1</i>	Interleukin 1 receptor, type I
Mm.1349	NM_010555	<i>Il1r2</i>	Interleukin 1 receptor, type II
Mm.103794	NM_021380	<i>Il20</i>	Interleukin 20
Mm.384038	NM_008368	<i>Il2rb</i>	Interleukin 2 receptor, beta chain
Mm.2923	NM_013563	<i>Il2rg</i>	Interleukin 2 receptor, gamma chain
Mm.983	NM_010556	<i>Il3</i>	Interleukin 3
Mm.276360	NM_021283	<i>Il4</i>	Interleukin 4
Mm.3448	NM_008370	<i>Il5ra</i>	Interleukin 5 receptor, alpha
Mm.2856	NM_010559	<i>Il6ra</i>	Interleukin 6 receptor, alpha
Mm.4364	NM_010560	<i>Il6st</i>	Interleukin 6 signal transducer
Mm.234466	NM_009909	<i>Cxcr2</i>	Chemokine (C-X-C motif) receptor 2
Mm.262106	NM_008401	<i>Itgam</i>	Integrin alpha M
Mm.1137	NM_008404	<i>Itgb2</i>	Integrin beta 2
Mm.87787	NM_010735	<i>Lta</i>	Lymphotoxin A
Mm.1715	NM_008518	<i>Ltb</i>	Lymphotoxin B
Mm.2326	NM_010798	<i>Mif</i>	Macrophage migration inhibitory factor
Mm.235137	NM_007926	<i>Aimp1</i>	Aminoacyl tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 1
Mm.288474	NM_009263	<i>Spp1</i>	Secreted phosphoprotein 1
Mm.248380	NM_011577	<i>Tgfb1</i>	Transforming growth factor, beta 1
Mm.1293	NM_013693	<i>Tnf</i>	Tumor necrosis factor
Mm.474976	NM_011609	<i>Tnfrsf1a</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a
Mm.235328	NM_011610	<i>Tnfrsf1b</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b
Mm.4861	NM_011616	<i>Cd40lg</i>	CD40 ligand
Mm.103551	NM_023764	<i>Tollip</i>	Toll interacting protein
Mm.390241	NM_011798	<i>Xcr1</i>	Chemokine (C motif) receptor 1
Mm.3317	NM_010368	<i>Gusb</i>	Glucuronidase, beta
Mm.299381	NM_013556	<i>Hprt</i>	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
Mm.2180	NM_008302	<i>Hsp90ab1</i>	Heat shock protein 90 alpha, class B member 1
Mm.304088	NM_008084	<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Mm.391967	NM_007393	<i>Actb</i>	Actin, beta

Anexo E. Informações sobre o tipo celular J774A.1, obtido da American Type Culture Collection (ATCC®). Fonte: J774A.1 (ATCC® TIB-67™) Product Sheet. Disponível em <https://www.atcc.org/Products/All/TIB-67.aspx#generalinformation>. Acesso em 22/07/2016.

Product Sheet

J774A.1 (ATCC® TIB-67™)**Please read this FIRST** **Intended Use**

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Catalog No. 30-2002. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 10%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: J774A.1 (ATCC® TIB-67™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Description

Organism: *Mus musculus*, mouse
Strain: BALB/cN
Tissue: ascites
Disease: reticulum cell sarcoma
Cell Type: monocyte; macrophage
Age: adult
Gender: female
Morphology: macrophage
Growth Properties: mostly adherent

Batch-Specific Information

Refer to the Certificate of Analysis for batch-specific test results.

SAFETY PRECAUTION

ATCC highly recommends that protective gloves and clothing always be used and a full face mask always be worn when handling frozen vials. It is important to note that some vials leak when submersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris.

Unpacking & Storage Instructions

1. Check all containers for leakage or breakage.
2. Remove the frozen cells from the dry ice packaging and immediately place the cells at a temperature below -130°C, preferably in liquid nitrogen vapor, until ready for use.

Handling Procedure for Frozen Cells

To insure the highest level of viability, thaw the vial and initiate the culture as soon as possible upon receipt. If upon arrival, continued storage of the frozen culture is necessary, it should be stored in liquid nitrogen vapor phase and not at -70°C. Storage at -70°C will result in loss of viability.

1. Thaw the vial by gentle agitation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes).
2. Remove the vial from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol. All of the operations from this point on should be carried out under strict aseptic conditions.
3. Transfer the vial contents to a centrifuge tube containing 9.0 mL complete culture medium, and spin at approximately 125 x g for 5 to 7 minutes.
4. Resuspend cell pellet with the recommended complete medium (see the specific batch information for the culture recommended dilution ratio), and dispense into a 25 cm² or a 75 cm² culture flask. It is important to avoid excessive alkalinity of the medium during recovery of the cells. It is suggested that, prior to the addition of the vial contents, the culture vessel containing the complete growth medium be placed into the incubator for at least 15 minutes to allow the medium to reach its normal pH (7.0 to 7.6).
5. Incubate the culture at 37°C in a suitable incubator. A 5% CO₂ in air atmosphere is recommended if using the medium described on this product sheet.

Handling Procedure for Flask Cultures

The flask was seeded with cells (see specific batch information) grown and completely filled with medium at ATCC to prevent loss of cells during shipping.

1. Upon receipt visually examine the culture for macroscopic evidence of any microbial contamination. Using an inverted microscope (preferably equipped with phase-contrast optics), carefully check for any evidence of microbial contamination. Also check to determine if the majority of cells are still attached to the bottom of the flask; during shipping the cultures are sometimes handled roughly and many of the cells often detach and become suspended in the culture medium (but are still viable).
2. **If the cells are still attached**, aseptically remove all but 5 to 10 mL of the shipping medium. The shipping medium can be saved for reuse. Incubate the cells at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until they are ready to be subcultured.
3. **If the cells are not attached**, aseptically remove the entire contents of the flask and centrifuge at 125 x g for 5 to 10 minutes. Remove shipping medium and save. Resuspend the pelleted cells in 10

Product Sheet

J774A.1 (ATCC® TIB-67™)

Please read this FIRST

Storage Temp.
liquid nitrogen
vapor phase

Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Catalog No. 30-2002. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 10%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: J774A.1 (ATCC® TIB-67™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

mL of this medium and add to 25 cm² flask. Incubate at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until cells are ready to be subcultured.

Subculturing Procedure

Subcultures are prepared by scraping. For a 75 cm² flask, remove all but 10 mL of the culture medium. Adjust volume accordingly for different culture vessels. Corning® T-75 flasks (catalog #430641) are recommended for subculturing this product. Dislodge cells from the flask substrate with a cell scraper, aspirate and dispense into new flasks.

Subcultivation Ratio: A subcultivation ratio of 1:3 to 1:6 is recommended

Medium Renewal: Replace or add medium two or three times weekly

Cryopreservation Medium

Complete growth medium supplemented with 5% (v/v) DMSO

Comments

J774A.1 cells are active in antibody dependent phagocytosis [Pubmed: 1101071]. Their growth is inhibited by dextran sulfate, PPD and LPS [Pubmed: 318922]. They synthesize large amounts of lysozyme and exhibits minor cytotoxicity but predominantly antibody-dependent phagocytosis. Interleukin 1 beta (IL1b) is synthesized continuously by this line.

Total RNA from this line is available as ATCC TIB-67R (100µg)

References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.

Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to ensure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.

© ATCC 2015. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [11/03]

ATCC Number: **TIB-67**
Designation: **J774A.1**

Low Density

High Density