



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Eduardo Luiz Papa Villa

**PAPEL DA O-GLICNACILAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DA
LESÃO PERIAPICAL EM CAMUNDONGOS**

Ribeirão Preto

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Eduardo Luiz Papa Villa

**PAPEL DA O-GLICNACILAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DA
LESÃO PERIAPICAL EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Cirurgião-
Dentista.

Orientadora: Sandra Yasuyo
Fukada Alves

Ribeirão Preto

2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Villa, Eduardo. **PAPEL DA O-GLICNACILAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DA LESÃO PERIAPICAL EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Cirurgião-dentista.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Gostaria, primeiramente, de agradecer à minha família, principalmente, meus pais Carla Maria Papa e Mario Luiz Villa. Pois só foi possível chegar até aqui graças à criação, ensinamentos, apoio e amor que me proporcionaram. Sempre estavam presentes e se desdobraram para dar tudo de melhor.

Agradeço a minha namorada e companheira Fernanda Andrade Bernardi, que está comigo desde o início dessa jornada. Sempre me apoiando, dando muito amor e sendo minha melhor amiga. Não poderia imaginar meu caminho até aqui sem ela.

Minha orientadora e professora Sandra Yasuyo Fukada Alves, pois foi quem me apresentou a área científica, sendo minha orientadora em minha iniciação científica e no trabalho de conclusão de curso. Pude aprender muito com ela, tanto em sala de aula como no laboratório.

Aos colegas de laboratório e a Thaise Mayumi Taira, pois foram eles que me ensinaram como funcionava o laboratório e a fazer todos os experimentos. Sem o conhecimento, ajuda e acolhimento de todos não seria possível concluir essa etapa.

A todos meus amigos e colegas da faculdade, que fizeram com que esses cinco anos fossem os melhores da minha vida.

A todos professores, que seja em sala de aula, na clínica ou nos corredores, sempre passaram todo conhecimento necessário para minha formação. Profissão a qual considero das mais nobres, pois sem professores não haveria a transmissão do conhecimento.

RESUMO

A lesão periapical é uma doença inflamatória/infecciosa com alta prevalência no mundo que se inicia com a invasão microbiana nos tecidos pulpaes se difundindo até o ápice dental, resultando na destruição dos tecidos periapicais, dentre eles ligamento periodontal, cemento e osso alveolar. Durante o percurso da doença, respostas imunológicas e inúmeros tipos celulares, dentre eles os osteoclastos, participam ativamente na reabsorção do tecido alveolar periapical. Para exercer tal função, os osteoclastos requerem um alto gasto de energia, visto que a deprivação de glicose inibe a capacidade de reabsorção óssea, enquanto níveis elevados de glicose, aumentam a sua diferenciação. Situações de alto níveis de glicose, como na hiperglicemia, levam a uma alteração da via das hexosaminas e, conseqüentemente, a O-GlcNAcilação, que consiste na incorporação de *O-linked- β -N-acetylglucosamine* (O-GlcNAc), em resíduos de serina e treonina de proteínas nucleares e citoplasmáticas pela ação da enzima OGT. A O-GlcNAcilação modula funções das proteínas alvos, de maneira análoga ao processo de fosforilação. Evidências de nosso grupo de pesquisa, mostram que O-GlcNAcilação de proteínas é fundamental para a osteoclastogênese *in vitro* e este tipo celular é crucial para o desenvolvimento da lesão periapical. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o papel biológico da O-GlcNAcilação no desenvolvimento da resposta inflamatória e da perda óssea em modelo de lesão periapical. Para isso, foram utilizados animais *Ctsk-Cre* e *Ctsk-Cre Ogt^{fl/fl}* para indução da lesão periapical e posteriormente foi avaliada histologicamente a área da lesão periapical, assim como a expressão de marcadores de osteoclastos e de citocinas inflamatórias, ambas por PCR em tempo real.

Os dados sugerem que embora não tenha alterado a expressão de marcadores e de mediadores inflamatórios, os animais *Ctsk^{Cre} OGT^{flox/flox}* apresentaram uma área de perda óssea e um perímetro da lesão periapical menores do que o grupo *Ctsk^{Cre}OGT^{0/0}*.

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	11
2.	PROPOSIÇÃO	16
	2.1 Determinar se a O-GlcNAcilação interfere na osteoclastogênese, atividade dos osteoclastos presentes na lesão.	16
	2.2 Avaliar se a O-GlcNAcilação interfere na resposta inflamatória local nos camundongos submetidos a lesão periapical experimental.	16
	2.3 Análise histológica da área e perímetro da lesão periapical.	16
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
	3.1 Animais	17
	3.2 Indução da lesão periapical	17
	3.3 Avaliação da expressão gênica de marcadores de osteoclastos, de genes relacionados ao sistema imune.	17
	3.4 Análise histomorfométrica da extensão da reabsorção óssea periapical	18
	3.5 Análise estatística	18
4.	RESULTADOS	19
	4.1 Avaliação da expressão gênica de marcadores inflamatórios nos linfonodos submandibulares.	19
	4.2 Avaliação da expressão gênica de marcadores de osteoclastos na lesão periapical induzida.	21
	4.3 Avaliação da reabsorção óssea na lesão periapical induzida	23
5.	DISCUSSÃO	27
6.	CONCLUSÃO.....	28
7.	REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

A lesão periapical é uma doença inflamatória, sendo que na maioria dos casos tem como causa a cárie dental, que é uma doença infecciosa ainda muito prevalente e afeta tanto crianças quanto adultos (Hao *et al.*, 2015). As bactérias ao invadirem e colonizarem a dentina, torna sua remoção muito difícil. Esta invasão microbiana, ao atingir os tecidos da polpa dental, induz uma resposta inflamatória local (Wang *et al.*, 2012), que ao ultrapassar a capacidade de defesa do hospedeiro leva a necrose do tecido pulpar. A necrose pulpar possibilita a penetração microbiana ao sistema de canais radiculares, posteriormente aos tecidos periapicais, levando a sua destruição. A migração desses microrganismos periodontopatogênicos pelo sistema de canais radiculares em direção ao forame apical e aos tecidos periodontais, acarreta a ativação do sistema imune inato pelo reconhecimento dos padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs). No entanto, esse mecanismo de defesa ativado, com o objetivo de conter os microrganismos, também pode induzir a reabsorção óssea periapical (Stashenko *et al.*, 1998) e consequente formação de tecido granuloso (Sasaki *et al.*, 2016). Pode se dizer que a reabsorção óssea como consequência da lesão periapical pode ocorrer tanto pela infecção microbiana assim como por parte da reação de defesa do hospedeiro (Kakehashi *et al.*, 1965; Azuma *et al.*, 2014). O processo de reabsorção óssea patológica ocorre geralmente quando há um desequilíbrio entre a atividade dos osteoclastos e osteoblastos, que são os dois principais tipos celulares envolvidos no processo de remodelamento ósseo, em que a formação da lesão apical ocorre por um aumento no número e na atividade dos osteoclastos na superfície do tecido ósseo alveolar (Guerrini & Takayanagi, 2014).

A diferenciação de osteoclastos é denominada de osteoclastogênese, e envolve vários estágios que vão desde o comprometimento de monócitos e/ou macrófagos em células precursoras de osteoclastos (estágio inicial), até a formação de células gigantes multinucleadas (estágio final) pela fusão de macrófagos (Segovia-Silvestre, 2009).

O NFATc1, é considerado o principal fator de transcrição regulador da diferenciação dos osteoclastos já que animais deficientes de NFATc1 especificamente em osteoclastos, desenvolvem osteopetrose (Winslow *et al.* 2006) O mecanismo pelo qual este fator de transcrição apresenta um papel essencial para a osteoclastogênese envolve não só a regulação de inúmeros genes relacionados a diferenciação e fusão

celular bem como genes relacionados a ativação dos osteoclastos: fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e catepsina K (Yavropoulou & Yovos, 2008).

Os osteoclastos maduros são únicos com a função de reabsorção óssea e a função adequada deste tipo celular é crítica para a homeostase do tecido ósseo. A reabsorção óssea exige uma série de modificações por parte dos osteoclastos maduros que compreendem um intenso remodelamento citoesquelético, polarização da membrana plasmática, redistribuição de transportadores e organelas e um intenso tráfego endossomal. A reabsorção óssea inicia com a formação da zona de selamento que é caracterizada pela adesão celular na superfície óssea mineralizada, por meio de integrina tipo alfa v beta 3 (integrina $\alpha v \beta 3$) e formação de lacunas de reabsorção, para onde são secretados ácido e enzimas proteolíticas. A manutenção do pH ácido, por H^+ ATPase vacuolares, nestas lacunas são importantes para amplificação da atividade das enzimas proteolíticas secretadas de vesículas, como o TRAP, Catepsina K e matriz metaloproteinase-9 (MMP-9), permitindo assim a desmineralização e degradação de colágeno (Kalervo-Vaananen *et al.*, 2008).

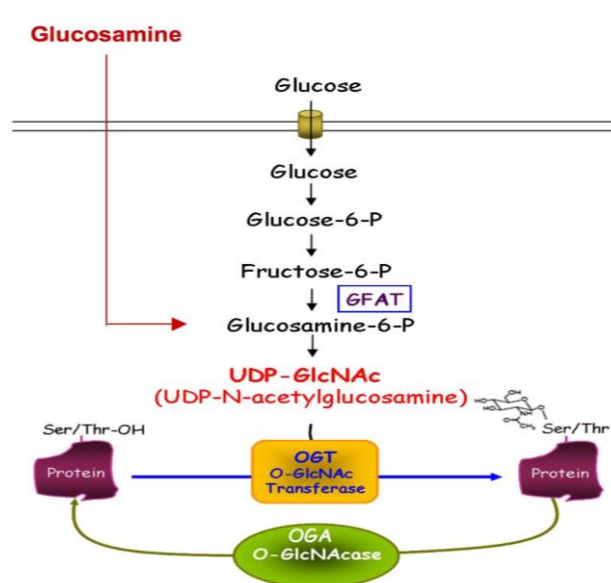
Considerando seu tamanho e sua função, os osteoclastos maduros demandam altos níveis de ATP para a biossíntese de diferentes constituintes utilizados durante a reabsorção óssea (Kim *et al.*, 2007a). De fato, inúmeros estudos mostram a importância de processos metabólicos não somente na função, mas também durante a formação dos osteoclastos. A participação da glicose e glutamina bem como de produtos da via glicolítica são essenciais para a formação de osteoclastos a partir de macrófagos murinos obtidos da medula óssea estimulados com RANKL, e para a reabsorção óssea (Indo *et al.*, 2013). Além disso, o piruvato, produto da glicólise, pode também estimular a osteoclastogênese *in vitro* e *in vivo*, ao aumentar níveis de AMPK (AMP-activated protein kinase) (Fong *et al.*, 2013).

A hiperglicemia, uma característica do diabetes, altera a via das hexosaminas e, consequentemente, a O-GlcNAcilação de proteínas. Tem sido mostrado que a adição de O-linked β -N-acetylglucosamine aos resíduos de serina/treonina do UDP-GlcNAc pela enzima OGT (O-GlcNAc transferase) modifica e, portanto, regula funções de proteínas nucleares e citoplasmáticas de maneira análoga ao processo de fosforilação (Torres e Hart, 1984). Sendo assim, os níveis de O-GlcNAcilação é dependente da disponibilidade de glicose, o qual é assimilada na via biossintética das hexoxaminas para formação do UDP-GlcNAc (Vocadlo D. 2012). Até o momento, foram identificadas mais de 4.000 proteínas-alvo de O-GlcNAcilação, incluindo fatores de transcrição e proteínas envolvidas

com o ciclo celular, metabolismo, epigênese, vias de sinalização entre outros (Ma *et al.*, 2014, Baudoin, 2015). No entanto, a identificação do que cada modificação pós-traducional representa nesses processos biológicos, ainda é bastante limitado se considerarmos o grande número de proteínas-alvo.

Diferentemente de outras modificações pós-traducionais, como a fosforilação que envolve diversas quinases e fosfatases, a O-GlcNAcilação envolve a atividade de apenas duas enzimas: a OGT (*uridinediphospho-N-acetyl-glucosamine:polypeptide β -N-acetylglucosaminyltransferase*) que é responsável pela inserção do O-GlcNAc e, a OGA (*β D-N-acetylglucosaminidase*) a qual faz a remoção do O-GlcNAc (Esquema 1). Sendo assim, a taxa de proteínas O-GlcNAcadas depende do balanço da atividade destas duas enzimas.

Esquema 1: Ilustração do ciclo de O-GlcNAcilação proteica regulada pelas enzimas OGT e OGA.



(modificado de Kanwal *et al.*, 2013).

Como mencionado anteriormente, existe uma analogia entre O-GlcNAcilação e a fosforilação proteica, e essas modificações pós-traducionais podem ser desencadeadas por modificações no ambiente celular induzidos por stress, hormônios ou nutrientes. As modificações, dinâmicas e reversíveis de proteínas, produzidas pela O-GlcNAcilação têm sido consideradas importantes reguladores-chave das disfunções celulares observadas em diversas patologias. Tem sido demonstrado que a O-GlcNAcilação pode

regular o desenvolvimento do câncer uma vez que vários oncogenes e supressores tumorais podem ser O-GlcNAcilados (Kang *et al.*, 2009; Sodi *et al.*, 2017). Estudos prévios mostram ainda que a O-GlcNAcilação ativa uma resposta inflamatória, visto que membros da família do NF- κ B podem ser alvos de O-GlcNAcilação e que este processo favorece outras mudanças pós-traducionais, como a acetilação, a qual aumenta a atividade destas proteínas (Allison *et al.*, 2012). Além disso, foi demonstrado que essa modificação pós-traducional de NF- κ B é dependente de OGT, uma vez que o aumento de O-GlcNAcilação mediado pela maior expressão de OGT resultou no aumento da atividade de NF- κ B em condições hiperglicêmicas (Yang *et al.*, 2008).

Como evidenciado, diferentes alvos em diferentes sistemas são O-GlcNAcilados e sofrem modificações funcionais, entretanto, existem poucos estudos sobre o papel da O-GlcNAcilação de proteínas relacionadas a função dos diferentes tipos celulares envolvidos com o remodelamento ósseo. Os estudos publicados até o momento focam no papel das modificações proteicas por O-GlcNAcilação na diferenciação e ativação de osteoblastos. Foi demonstrado um aumento global de proteínas O-GlcNAciladas nas diferentes fases de diferenciação dos osteoblastos, e que modificações proteicas produzidas por O-GlcNAc regulam a expressão de osteocalcina, que é uma proteína secretada por osteoblastos (Kim *et al.*, 2007b).

A literatura é escassa no que se refere aos estudos descrevendo o papel da O-GlcNAcilação na osteoclastogênese, os estudos até o momento dão enfoque aos processos metabólicos na osteoclastogênese. Neste sentido, observa-se um aumento no consumo de glicose e oxigênio, assim como na produção de lactato nas diferentes fases de proliferação, migração e fusão de pré-osteoclastos. Foi evidenciado ainda que, níveis elevados de glicose no meio de cultura aumentam a diferenciação dos osteoclastos, enquanto a deprivação de glicose inibe a capacidade de reabsorção destas células (Indo *et al.*, 2013). Vale ressaltar a importância do aumento metabólico para a atividade de osteoclastos, uma vez que osteoclastos maduros demandam altos níveis de ATP para a biossíntese de diferentes constituintes utilizados durante a reabsorção óssea (Kim *et al.*, 2007a).

Estudo recente de nosso grupo de pesquisa apoiado pela FAPESP (2015/09034-0) avaliou se esta modificação pós-traducional, a O-GlcNAcilação, regularia a diferenciação e, a capacidade de reabsorção dos osteoclastos *in vitro*. Os dados obtidos até o momento, sugerem que a O-GlcNAcilação de proteínas via OGT, apresentam um papel funcional na osteoclastogênese induzida por RANKL em células da medula óssea

de camundongos. Isso pôde ser notado uma vez que o estímulo com RANKL promoveu aumento dos níveis de proteínas O-GlcNAc, que foi sustentado até fase final de diferenciação. O impacto do acúmulo de proteínas O-GlcNAc na diferenciação dos osteoclastos foi avaliado utilizando como ferramentas farmacológicas inibidores de OGT. A inibição de OGT reprimiu a diferenciação de osteoclastos (células multinucleadas TRAP-positivas). A expressão de NFATc1, principal fator de transcrição de osteoclastos; da integrina α V, importante para a fusão dos osteoclastos; e da enzima catepsina K, importante para o processo de reabsorção bem como a capacidade de reabsorção de matriz mineralizada dos osteoclastos maduros, também foram reduzidas com a inibição de OGT. Embora ainda não saibamos exatamente qual/quais proteínas sofrem a O-GlcNAcilação, em conjunto, nossos dados fornecem fortes indícios de que essa modificação proteica é crucial para a osteoclastogênese.

Considerando esses dados *in vitro*, e com o objetivo de esclarecer o papel da O-GlcNAcilação na remodelagem óssea *in vivo*, o presente estudo utilizou como ferramenta, o sistema de animais Cre-loxP que permite obter animais deficientes de uma proteína especificamente em um tipo celular. O sistema de recombinação Cre-lox consiste em dois elementos: a enzima recombinase Cre e os sítios lox. A enzima Cre pode recombinar as sequências do sítio lox, detectando-as e cortando-as especificamente, e os efeitos funcionais desta enzima como deleção, inversão ou translocação cromossômica são dependentes da direção e posição dos locais lox (Peng *et al.*, 2014). No [resente estudo o efeito da enzima Cre nestes animais é a deleção de OGT (OGT^{flox/flox}). Além da cultura de osteoclastos *in vitro* a partir de células da medula óssea, o sistema Cre-lox (Orban *et al.*, 1992) direcionado ao gene dos osteoclastos também tem sido utilizado para identificar a participação dos osteoclastos frente a diversas patologias. Este sistema permite a deleção específica de um gene alvo em um tipo celular ou tecido. Para essa deleção, o *promoter* de escolha deve ser suficientemente ativo para excluir completamente o gene alvo, mas apenas no tecido de interesse (Chiu *et al.*, 2004). Dentre as regiões promotoras específicas em osteoclastos, Chiu *et al.*, 2004 avaliaram que o promotor de Catepsina K pode ser o mais compatível com a expressão de Cre especificamente em osteoclastos, sendo então gerado a linha transgênica Catepsina K-Cre (Cstk^{Cre}).

Portanto, utilizaremos animais CstkCre - OGTflox, ou seja, os animais deficientes da proteína OGT exclusivamente em osteoclastos. A utilização de animais (Cstk)Cre OGTflox/flox neste projeto é crítico porque permite determinar o papel de OGT

especificamente nos osteoclastos, uma vez que a O-GlcNAcilação pode incorrer em efeitos diferentes de acordo com o tipo celular. Levando em consideração que a periodontite é uma doença lítica exacerbada em situações de altos níveis glicêmicos como por exemplo no diabetes, e nossos resultados mostrando que a O-GlcNAcilação é crucial para a osteoclastogênese o que se espera é determinar se essa modificação pós traducional está envolvida na perda óssea induzida por periodontite em animais. O entendimento do papel da O-GlcNAcilação, especificamente nos osteoclastos durante o processo patológico de perda óssea em lesão periapical, poderia conferir uma possível aplicação clínica para contenção desta patologia no futuro.

2. PROPOSIÇÃO

Investigar o papel da O-GlcNAcilação, especificamente nos osteoclastos, no desenvolvimento da resposta inflamatória e da perda óssea em modelo de lesão periapical induzida em camundongos deficientes para a enzima OGT em osteoclastos (Ctsk^{Cre}OGT^{f/f}) em relação aos animais WT (Ctsk^{Cre}OGT^{0/0}).

2.1 Determinar se a O-GlcNAcilação interfere na osteoclastogênese, atividade dos osteoclastos presentes na lesão.

Para isso, a expressão de marcadores de osteoclastos (*Acp5*, *Catepsina K* e *MMP-9*) foi avaliada por PCR em tempo real nas amostras de hemi-mandíbulas com lesão periapical induzida em camundongos deficientes para a enzima OGT em osteoclastos (Ctsk^{Cre}OGT^{f/f}) em relação aos animais WT (Ctsk^{Cre}OGT^{0/0}). Além disso foram medidas, em lâminas histológicas, a área e o perímetro da lesão periapical.

2.2 Avaliar se a O-GlcNAcilação interfere na resposta inflamatória local nos camundongos submetidos a lesão periapical experimental.

Para isso foram avaliados os fatores de transcrição de células T como o *RORγt*, *Foxp-3*, mediadores inflamatórios expressos nos linfonodos da região de cabeça e pescoço pela técnica de PCR em tempo real (IL-1β, IL-17).

2.3 Análise histológica da área e perímetro da lesão periapical.

Cortes semi-seriados de cinco micrômetros foram corados com hematoxilina e eosina (HE), e a área (mm²) e o perímetro (mm) da lesão periapical foram mensurados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo CEUA da FCFRP-USP (Protocolo:17.1.1134.60.2)

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas como controle ($Ctsk^{Cre}OGT^{0/0}$) e deficientes para a enzima OGT nos osteoclastos ($Ctsk^{Cre}OGT^{f/f}$) entre 6 e 8 semanas de idade. Os animais serão mantidos em caixas pequenas (5 animais/caixa) no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Os mini-isoladores dos animais foram forrados com maravalha e ficaram organizados em estantes ventiladas com sistemas independentes de insuflamento e exaustão de ar. Os animais foram alimentados com ração estéril à vontade e água filtrada *ad libitum*.

3.2 Indução da lesão periapical

Uma vez genotipados, os animais $Ctsk^{Cre}OGT^{0/0}$ e $CtsK^{Cre}OGT^{f/f}$ foram anestesiados por administração intraperitoneal de cloridrato de Cetamina (Ketamina 10%, Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A. Embu-Guaçu, SP) na dosagem de 0,1 mL/Kg de peso, e cloridrato de Xilazina (Anasedan[®] 2%, Ceva Santé Animale S/A. Paulínea, SP), também na dosagem de 0,1 mL/Kg de peso e submetidos ao protocolo clássico de indução de lesão periapical (De Rossi *et al.*, 2008; Da Silva *et al.*, 2012). Os animais foram posicionados em mesa cirúrgica para realizar uma abertura coronária no primeiro molar inferior direito com uma broca esférica de aço inoxidável 1/4 acoplada à caneta de baixa rotação e contra-ângulo. A polpa foi exposta e a entrada do canal distal foi certificada com uma lima endodôntica 08. O tamanho da exposição foi padronizado de acordo com o diâmetro da broca e os canais foram deixados expostos ao meio ambiente bucal. O primeiro molar do lado esquerdo, sem exposição pulpar, constituirá o grupo controle. Após 14 dias, os animais foram submetidos à eutanásia com superdose anestésica.

3.3 Avaliação da expressão gênica de marcadores de osteoclastos, de genes relacionados ao sistema imune.

A fim de avaliarmos a expressão gênica de marcadores de osteoclastos e marcadores de células T em hemi-mandíbulas e linfonodos da região de cabeça e pescoço, foi feita a trituração dos tecidos, seguido de isolamento de RNA total utilizando o Kit da Promega SV Total Isolation System (Z3105- Promega), de acordo com o cartão de

protocolo 9FB025 indicado pelo fabricante. Em seguida, a síntese de cDNA foi realizada por meio da reação de transcriptase reversa (High capacity cDNA Reverse Transcription kit da Applied Biosystems- 4368813). Sequencialmente, a reação de PCR para amplificação dos genes de interesse foi realizada utilizando os primers específicos (TaqMAN® Gene Expression Assay) para marcadores de osteoclastos como *Trap* (*Acp5*), *Catepsina K* (*Cstk*) e *Metaloproteinase da matriz - 9* (*MMP-9*) e fatores de transcrição de células T como o *RORγt* (*Rorc*), *Foxp-3*, bem como de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-17.

3.4 Análise histomorfométrica da extensão da reabsorção óssea periapical

Com os animais eutanasiados, as mandíbulas foram coletadas e ficaram imersas em formol tamponado a 10% em temperatura ambiente e após 24h elas foram lavadas em água corrente durante 8 horas. Então as hemi-mandíbulas foram submersas em solução à base de EDTA a 10% (pH 7,4) durante 30 dias, para o processo de descalcificação. Uma vez descalcificadas as amostras foram lavadas por 2 horas em água corrente e então foram desidratadas. As hemi-mandíbulas foram imersas em parafina fundida e mantidos em estufa por 4 horas. Em seguida as amostras foram incluídos em blocos de parafina. Utilizando o micrótomo (Leica RM2145; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) os blocos com as amostras foram cortados no sentido vestibulo-lingual. E então foram selecionados os cortes que possibilitavam a visualização da raiz e do ápice aberto do 1º molar inferior e corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise histomorfométrica. As lesões periapicais foram demarcadas no ImageJ Software e suas áreas foram mensuradas em mm² e perímetros em mm.

3.5 Análise estatística

As análises dos resultados foram realizadas de acordo com os grupos experimentais. Na análise comparativa de dois grupos experimentais foi utilizado o teste “t” de Student e em mais de dois grupos experimentais foram utilizados o método de variância a um critério (One-way ANOVA), seguido de pós-teste conforme apropriado e de acordo com as variáveis e grupos comparados sendo que as diferenças consideradas significativas para valores de $P < 0,05$ foram determinadas utilizando GraphPad Software 8.0 (GraphPad Prism; GraphPad Software, San Diego).

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da expressão gênica de marcadores inflamatórios nos linfonodos submandibulares.

Primeiramente, para avaliar se a deleção de OGT afeta o processo inflamatório durante o estabelecimento da lesão periapical, , foi feita a análise de PCR em tempo real nas amostras de linfonodos submandibulares coletados após 14 dias de indução da lesão nos camundongos CtsK^{-Cre} (controle) e CtsK^{Cre}OGT^{f/f}. Ao analisar a expressão gênica das citocinas inflamatórias nos linfonodos como o IL1- β e a IL17A, observamos que não houve uma diferença significativa entre os grupos controle e deficientes para OGT no tempo de 14 dias após a lesão. Além disso, avaliamos também alguns fatores de transcrição como Rorc e Foxp3, os quais estão relacionados com a diferenciação de células Th17 e células T reguladoras e são importantes para a modulação da osteoclastogênese e atividade dos osteoclastos presentes na região da lesão periapical. Como podemos observar nas Figuras 1, 2, 3 e 4 a expressão desses marcadores também não foi alterada nos linfonodos submandibulares após o período de 14 dias de lesão periapical.

Figura 1. Expressão gênica de IL-17A nos linfonodos de animais controle (CtsK^{-Cre}) e nos animais deficientes para OGT nos osteoclastos (CtsK^{Cre}OGT^{f/f}). Após 14 dias de exposição pulpar, foi avaliada a expressão de IL-17A nas amostras de linfonodos de animais controle e deficientes para OGT nos osteoclastos. Analisado por teste t de Student. (n=7/9).

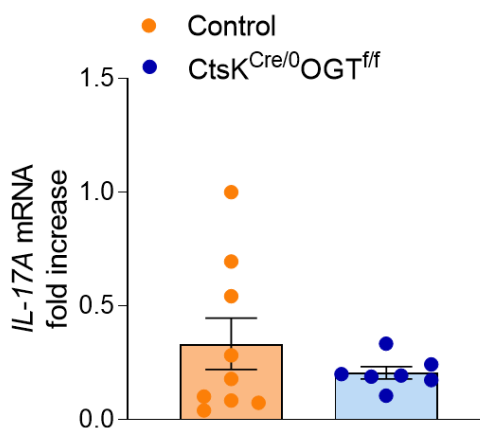


Figura 2. Expressão gênica de IL-1 β nos linfonodos de animais controle (CtsK^{-Cre}) e nos animais deficientes para OGT nos osteoclastos (CtsK^{Cre}OGT^{f/f}). Após 14 dias de exposição pulpar, foi avaliada a expressão de IL-1 β nas amostras de linfonodos de animais controle e deficientes para OGT nos osteoclastos. Analisado por teste t de Student. (n=7/10).

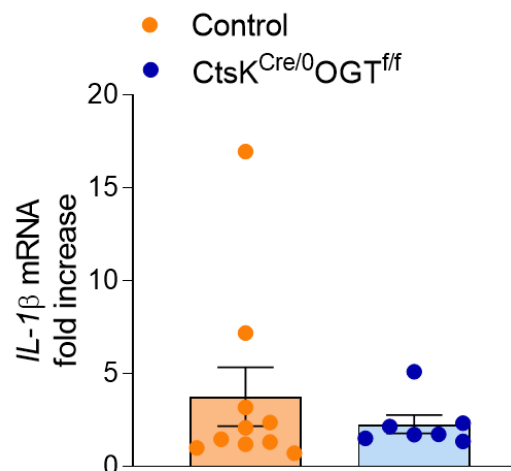


Figura 3. Expressão gênica de Foxp3 nos animais controle (CtsK^{-Cre}) e nos animais deficientes para OGT nos osteoclastos (CtsK^{Cre}OGT^{f/f}). Após 14 dias de exposição pulpar, foi avaliada a expressão de Foxp3 nas amostras de linfonodos de animais controle e deficientes para OGT nos osteoclastos. Analisado por teste t de Student. (n=7/10).

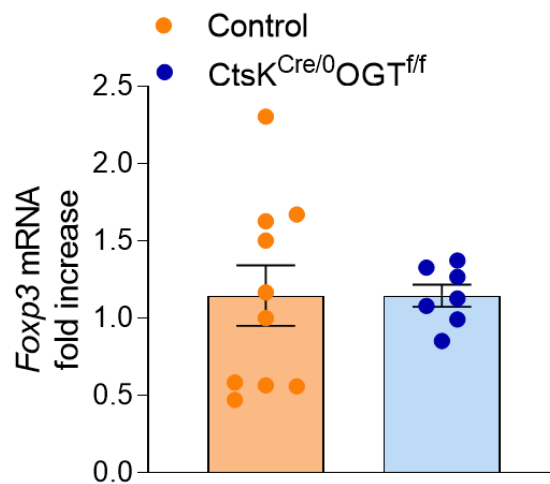
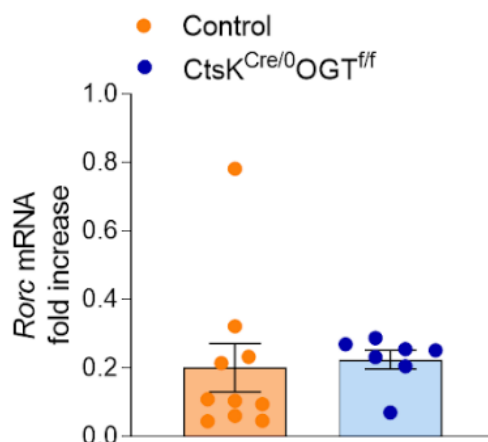


Figura 4. Expressão gênica de *Rorc* nos animais controle ($CtsK^{Cre}$) e nos animais deficientes para OGT nos osteoclastos ($CtsK^{Cre}OGT^{f/f}$). Após 14 dias de exposição pulpar, foi avaliada a expressão de *Rorc* nas amostras de linfonodos de animais controle e deficientes para OGT nos osteoclastos. Analisado por teste t de Student. (n=7/10).



4.2 Avaliação da expressão gênica de marcadores de osteoclastos na lesão periapical induzida.

Considerando que a deleção de OGT nos osteoclastos não mostrou alteração na expressão de marcadores do processo inflamatório nos linfonodos de animais submetidos ao modelo de lesão periapical induzida, avaliamos se a deleção afetaria a expressão de marcadores da osteoclastogênese e consequentemente a perda óssea. Para isso, primeiramente foi avaliada a expressão de *Trap*, que é o marcador de diferenciação e atividade dos osteoclastos. Como podemos observar na Figura 5 não observamos diferença significativa na expressão de *Trap* entre os grupos avaliados. Em seguida, avaliou-se também a expressão gênica de marcadores de atividades de osteoclastos, Catepsina K e MMP-9, que são as principais enzimas responsáveis pela degradação de colágeno e matriz óssea. Ao observar as Figuras 6 e 7, podemos notar que não houve diferença entre os grupos avaliados, sugerindo que a deleção de OGT não altera a expressão de marcadores relacionados a atividade dos osteoclastos no período de 14 dias de lesão periapical. Vale ressaltar que era esperado que o modelo experimental de lesão periapical induzisse um aumento da expressão gênica desses marcadores, uma vez que o modelo experimental de lesão periapical induz a osteoclastogênese e a perda óssea, no entanto, não foi observado diferença estatisticamente significativa. Isso pode ter ocorrido devido ao tempo experimental escolhido na análise, pois todas as amostras foram extraídas após 14 dias da realização da lesão periapical. Nossa hipótese é que o pico da

expressão gênica desses marcadores poderia ter sido detectado em tempos iniciais da lesão periapical. Ainda, como a O-GlcNAcilação é uma modificação pós-traducional, talvez a avaliação gênica não seja a melhor metodologia a ser avaliada e sim, uma avaliação proteica.

Figura 5. Avaliação da expressão gênica de Trap nos animais controle ($CtsK^{Cre}$) e nos animais deficientes para OGT nos osteoclastos ($CtsK^{Cre}OGT^{fl/fl}$). Após 14 dias de exposição pulpar, foi avaliada a expressão de Trap nas amostras de hemi-mandíbulas com lesão periapical e lado controle. Analisado por One-way ANOVA. (n=5/6).

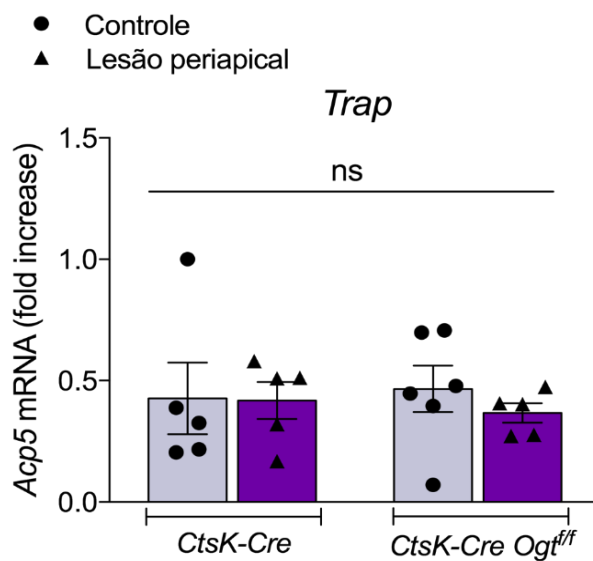


Figura 6. Avaliação da expressão gênica de MMP-9 nos animais controle ($CtsK^{Cre}$) e nos animais deficientes para OGT nos osteoclastos ($CtsK^{Cre}OGT^{fl/fl}$). Após 14 dias de exposição pulpar, foi avaliada a expressão de Cathepsina K nas amostras de hemi-mandíbulas com lesão periapical e lado controle. Analisado por One-way ANOVA. (n=5/6).

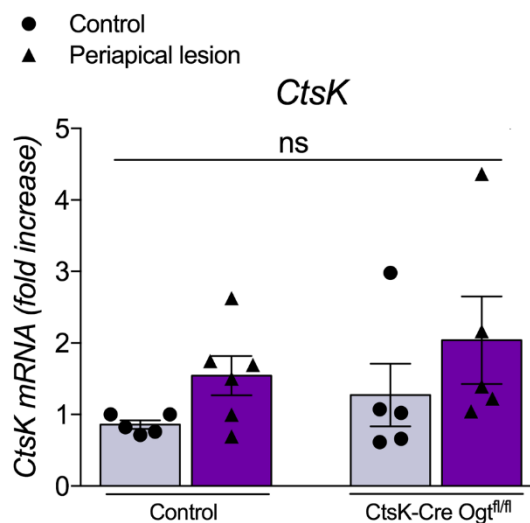
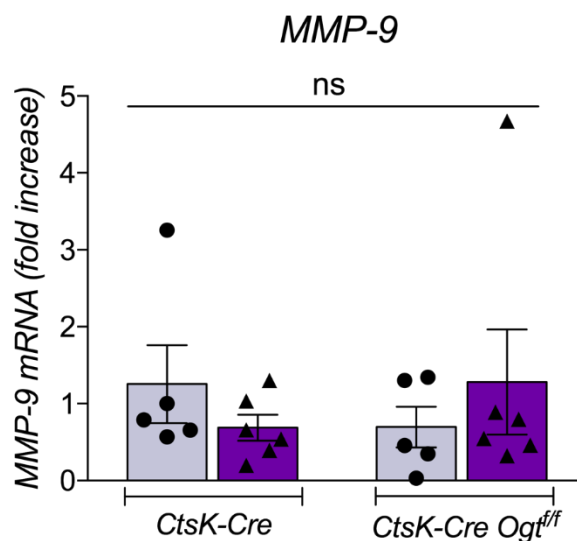


Figura 7. Avaliação da expressão gênica de MMP-9 nos animais controle ($CtsK^{Cre}$) e nos animais deficientes para OGT nos osteoclastos ($CtsK^{Cre}OGT^{fl/fl}$). Após 14 dias de exposição pulpar, foi avaliada a expressão de MMP-9 nas amostras de hemi-mandíbulas com lesão periapical e lado controle. Analisado por One-way ANOVA. (n=5/6).



4.3 Avaliação da reabsorção óssea na lesão periapical induzida

Como foi visto anteriormente, não foi possível notar uma diferença significativa na expressão gênica de marcadores inflamatórios e de marcadores de osteoclastos nas amostras de lesão periapical induzida. Sendo assim, fomos avaliar se a O-GlcNAcilação teria um efeito na formação da lesão e perda óssea induzida pelo modelo experimental. Como podemos ver na Figura 8A e 8B, nas amostras sem a lesão periapical induzida, tanto nos animais do grupo controle como nos animais com deleção de OGT nos osteoclastos, notamos um ligamento periodontal saudável e ausência de infiltrado inflamatório, na região periapical da raiz distal. Nas imagens de cortes com lesão periapical induzida (Figura 9), observa-se que há presença de infiltrado inflamatório na região periapical, alteração no tecido pulpar sugerindo uma necrose do tecido, destruição dos tecidos periapicais e do osso alveolar, em ambos os grupos.

Contudo, ao avaliar a área e o perímetro da lesão periapical nos animais WT e nos animais com deleção de OGT nos osteoclastos, foi possível notar uma diferença significativa entre os grupos (Figura 10 e 11). Visto que o grupo dos animais deficientes para OGT apresentaram tanto uma área como um perímetro significativamente menor quando comparados ao grupo controle, esses dados sugerem que uma possível

participação da O-GlcNAcilação na ativação dos osteoclastos e a consequentemente na reabsorção óssea durante o desenvolvimento da lesão periapical. Já no grupo sem a lesão periapical induzida, foi avaliado o espaço periapical, comparando os animais WT e os animais com deleção de OGT nos osteoclastos, a fim de verificar se havia alguma diferença nos tecidos periapicais causada pela inibição da O-GlcNAcilação. Mas não foi possível notar diferença significativa nas análises estatísticas (Figura 12 e 13).

Figura 8. Fotos representativas dos cortes do grupo sem lesão, corados em HE. Cortes histológicos da região periapical da raiz distal do primeiro molar inferior esquerdo (sem lesão). (A) WT e (B) $CtsK^{Cre}OGT^{f/f}$. Barra = 0,2mm. Fotografia no aumento de 10x.

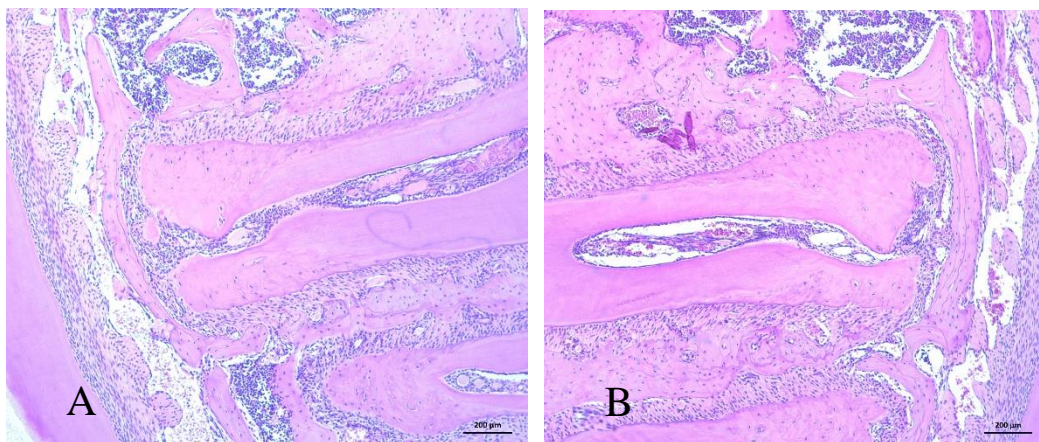


Figura 9. Fotos representativas dos cortes do grupo com lesão periapical, corados em HE. Cortes histológicos da região periapical da raiz distal do primeiro molar inferior esquerdo (sem lesão). (A) WT e (B) $Ctsk^{Cre}OGT^{flox/flox}$. Barra = 0,2mm. Fotografia no aumento de 10x.

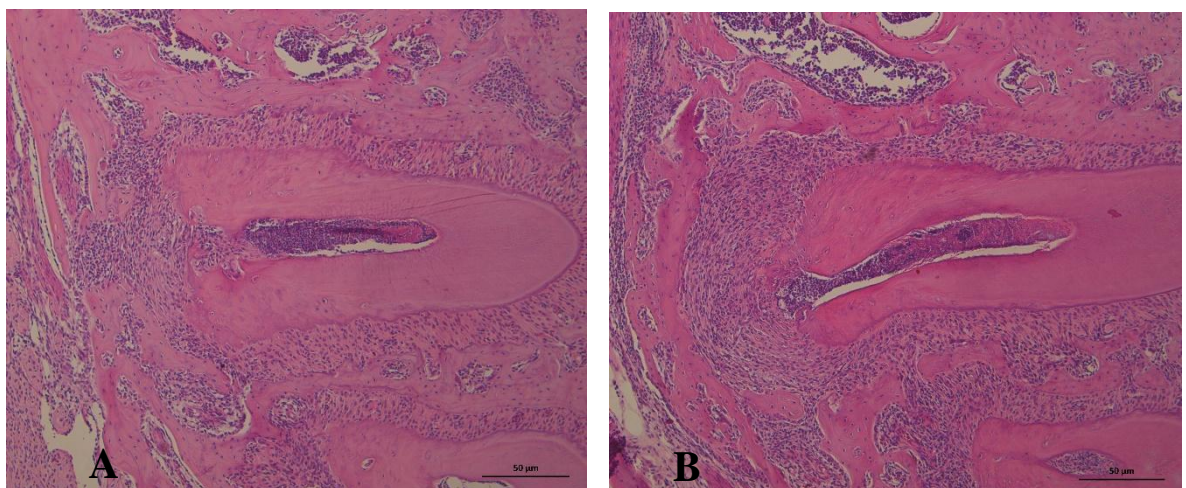


Figura 10. Análise histomorfométrica do tamanho da lesão periapical após 14 dias. Avaliação da área da lesão periapical em mm², comparando os animais controle (CtsK^{-Cre}) com os animais deficientes para OGT nos osteoclastos (CtsK^{Cre}OGT^{f/f}). A barra indica média \pm desvio padrão da média. **P < 0,01 indica diferença estatisticamente significativa, avaliado por teste t de Student.

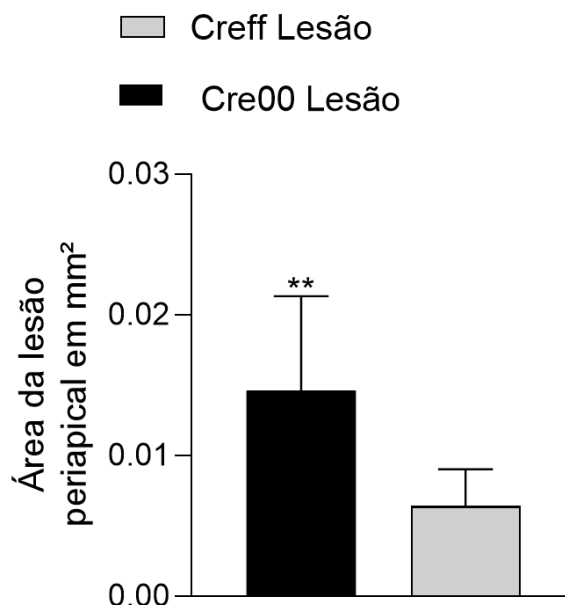


Figura 11. Análise histomorfométrica do tamanho da lesão periapical após 14 dias. Avaliação do perímetro da lesão periapical em mm, comparando os animais controle (CtsK^{-Cre}) com os animais deficientes para OGT nos osteoclastos (CtsK^{Cre}OGT^{f/f}). A barra indica média \pm desvio padrão da média. *P < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa, avaliado por teste t de Student.

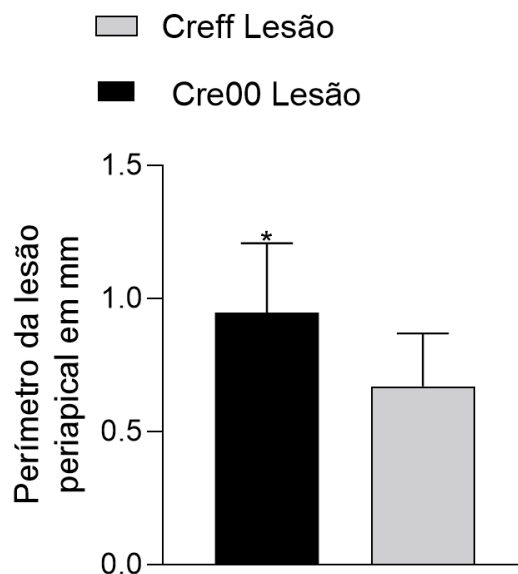


Figura 12. Análise histomorfométrica do tamanho do espaço periapical após 14 dias. Avaliação da área do espaço periapical em mm^2 , comparando os animais controle (CtsK^{Cre}) com os animais deficientes para OGT nos osteoclastos ($\text{CtsK}^{\text{Cre}}\text{OGT}^{\text{f/f}}$). A barra indica média \pm desvio padrão da média. Avaliado por teste t de Student.

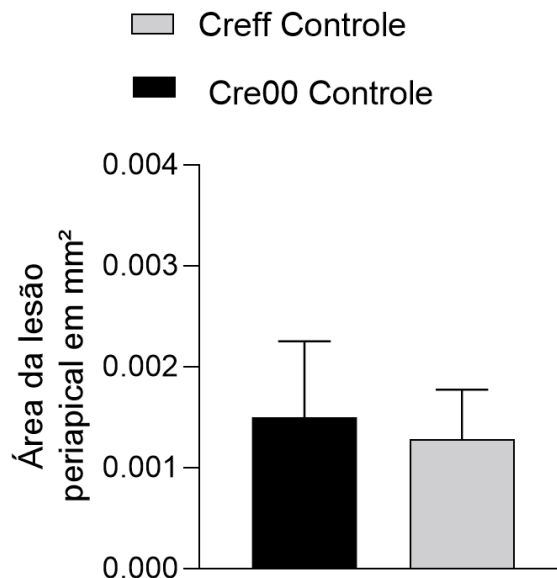
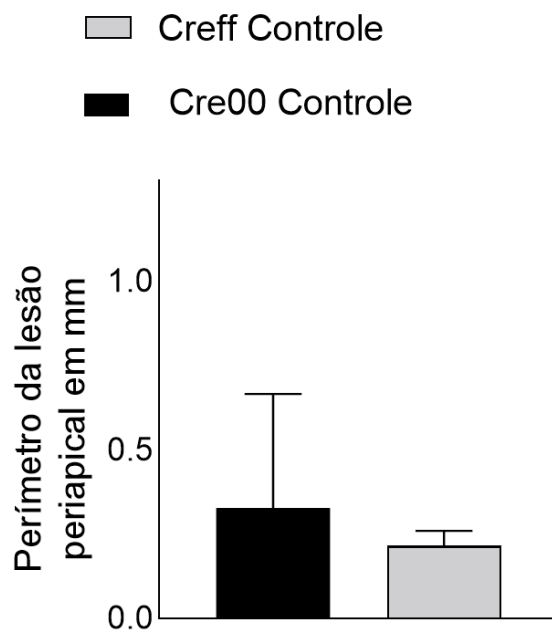


Figura 13. Análise histomorfométrica do tamanho do espaço periapical após 14 dias. Avaliação do perímetro do espaço periapical em mm, comparando os animais controle (CtsK^{Cre}) com os animais deficientes para OGT nos osteoclastos ($\text{CtsK}^{\text{Cre}}\text{OGT}^{\text{f/f}}$). A barra indica média \pm desvio padrão da média. Avaliado por teste t de Student.



5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que com a exposição do tecido pulpar ao ambiente bucal e a consequente contaminação do sistema de canais radiculares em direção ao forame apical e ao osso adjacente, houve uma reabsorção óssea periapical. Condizendo com os resultados de Stashenko *et al.*, 1998. Essa reabsorção óssea ocorreu em ambos os grupos, entretanto, houve uma diferença significativa entre os grupos na área de reabsorção óssea periapical e no perímetro da lesão.

Estudos prévios de (Allison *et al.*, 2012) mostram que membros da família de NF- κ B podem ser alvos da O-GlcNAcilação, com isso induzindo uma ativação da resposta inflamatória. Entretanto, neste estudo se analisou a influência sobre outras citocinas inflamatórias nos linfonodos submandibulares, como IL1- β , IL-17 e Rorc e Foxp3 que são fatores de transcrição para diferenciação de células Th17 e células T reguladoras. E não foi possível diferenciar os grupos de animais WT e deficientes para a enzima OGT em osteoclastos. Isso pode ter ocorrido pois a ausência da OGT é exclusiva nos osteoclastos.

Trabalhos mais recentes, como de Takeuchi *et al.*, 2020 evidenciou que a inibição da O-GlcNAcilação suprime a osteoclastogênese nos modelos de diferenciação de osteoclastos *in vitro*, corroborando com a possibilidade da O-GlcNAcilação interferir na osteoclastogênese. Em contrapartida, nesse estudo, não se observou o resultado esperado quanto a expressão gênica dos marcadores de osteoclastos. Isso pode ter ocorrido devido ao tempo experimental avaliado, pois todas as amostras foram extraídas após 14 dias da realização da lesão periapical e talvez o pico da expressão gênica desses marcadores poderia ter ocorrido em tempos iniciais da lesão periapical. Ainda, como a O-GlcNAcilação é uma modificação pós-traducional, talvez a avaliação gênica não seja a melhor metodologia a ser avaliada e sim, uma avaliação proteica.

No presente trabalho a inibição da O-GlcNAcilação foi feita através da deleção gênica. Já no trabalho de Myoung Jun Kim *et al.*, 2021 avaliaram uma outra forma da inibição da O-GlcNAcilação, pela via farmacológica, utilizando o inibidor de pequenas moléculas OSMI-1, que resultou na redução da osteoclastogênese, tanto *in vivo* quanto

in vitro. Além disso, mostrou-se que a inibição do gene responsável pela enzima OGT com o uso do shRNA, mimetizou o efeito do OSMI-1 sobre a osteoclastogênese.

6. CONCLUSÃO

Embora não tenha alterado a expressão de marcadores e de mediadores inflamatórios, nossos dados mostram que a deleção de OGT nos osteoclastos inibiu a perda óssea periapical, onde animais CtsK^{Cre}OGT^{f/f} apresentaram uma área e perímetro de lesão periapical significativamente menor que os animais controles quando avaliados histologicamente.

7. REFERÊNCIAS

- Allison DF, Wamsley JJ, Kumar M, Li D, et al. Modification of RelA by O-linked Nacetylglucosamine links glucose metabolism to NF-κB acetylation and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012, 16;109(42):16888-93.
- Azuma MM, Samuel RO, Gomes-Filho JE, Dezan-Junior E, Cintra LT. The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review. *Int Endod J*. 2014, Jul;47(7):615-21.
- Baudoin L, Issad T. O-GlcNAcylation and Inflammation: A Vast Territory to Explore. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015, 9;5:235.
- Chiu WS, McManus JF, Notini AJ, Cassady AI, Zajac JD, Davey RA. Transgenic mice that express Cre recombinase in osteoclasts. *Genesis*. 2004, Jul;39(3):178-85.
- Fong JE, Le Nihouannen D, Tiedemann K, Sadvakassova G, Barralet JE, Komarova SV. Moderate excess of pyruvate augments osteoclastogenesis. *Biol Open*. 2013, Mar 22;2(4):387-95.
- Guerrini MM, Takayanagi H. The immune system, bone and RANKL. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2014, 561; 118–123.
- Hao L, Chen W, McConnell M, Zhu Z, Li S, Reddy M, Eleazer PD, Wang M, Li YP. A small molecule, odanacatib, inhibits inflammation and bone loss caused by endodontic disease. *Infect Immun*. 2015, Apr;83(4):1235-45.

- Indo Y, Takeshita S, Ishii KA, Hoshii T, et al. Metabolic regulation of osteoclast differentiation and function. *J Bone Miner Res*. 2013, 28(11):2392-9.
- Kalervo Väänänen H, Laitala-Leinonen T. Osteoclast lineage and function. *Arch of Biochemistry and Biophysics*. 2008, 473(2): 132–138.
- Kang JG, Park SY, Ji S, Jang I, et al. O-GlcNAc protein modification in cancer cells increases in response to glucose deprivation through glycogen degradation. *J Biol Chem*. 2009, 284:34777-84.
- Kanwal S, Fardini Y, Pagesy P, N'tumba-Byn T, Pierre-Eugène C, Masson E, Hampe C, Issad T. OGlcNAcylation-inducing treatments inhibit estrogen receptor α expression and confer resistance to 4OH-tamoxifen in human breast cancer-derived MCF-7 cells. *PLoS One*. 2013 Jul 11;8(7):e69150.
- Kim EJ. Chemical Arsenal for the Study of O-GlcNAc. *Molecules*. 2011, 16, 1987-2022.
- Kim JM, Jeong D, Kang HK, Jung SY, et al. Osteoclast precursors display dynamic metabolic shifts toward accelerated glucose metabolism at an early stage of RANKL-stimulated osteoclast differentiation. *Cell Physiol Biochem*. 2007a, 20(6):935-46.
- Ma J, Hart GW. O-GlcNAc profiling: from proteins to proteomes. *Clin Proteomics*. 2014, Mar 5;11(1):8.
- Nagel AK, Ball LE. O-GlcNAc Modification Of The Runt-Related Transcription Factor 2 (Runx2) Links Osteogenesis And Nutrient Metabolism In Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Mol Cell Proteomics*. 2014, 13(12):3381-95.
- Orban PC, Chui D, Marth JD. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992, Aug 1;89(15):6861-5.
- Peng LY, Cheng T, Yuan WP. Commonly used cre transgenic mice and their applications in hematopoietic system. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2014, Oct;22(5):1442-7.
- 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.
- Stashenko P1, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(4):498-521.
- Segovia-Silvestre T, Neutzsky-Wulff AV, Sorensen MG, Christiansen C, Bollerslev J, Karsdal MA, Henriksen K. Advances in osteoclast biology resulting from the study of osteopetrotic mutations. *Hum Genet*. 2009, Jan; 124(6):561-77.
- Sodi VL, Bacigalupa ZA, Ferrer CM, Lee JV, Gocal WA, Mukhopadhyay D, Wellen KE, Ivan M, Reginato MJ. Nutrient sensor O-GlcNAc transferase controls cancer lipid metabolism via SREBP1 regulation. *Oncogene*. 2017, Feb 15;37(7):924-934.

Torres CR, Hart GW. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem.* 1984, 10;259(5):3308-17.

Vocadlo DJ. O-GlcNAc processing enzymes: catalytic mechanisms, substrate specificity, and enzyme regulation. *Curr Opin Chem Biol.* 2012, Dec;16(5-6):488-97.

Wang QQ1, Zhang CF, Chu CH, Zhu XF. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int J Oral Sci.* 2012, Mar;4(1):19-23.

Winslow MM, Pan M, Starbuck M, et al. Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass. *Dev Cell* 2006, 10:771-82.

Yang WH, Park SY, Nam HW, Kim DH, Kang JG, Kang ES, Kim YS, Lee HC, Kim KS, Cho JW.

NFκB activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008, Nov 11;105(45):17345-50.

Yavropoulou MP, Yovos JG. Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2008, 8(3):204-16.

Zachara NE, Hart G W. Cell Signaling, The Essential Role of O-GlcNAc! *Biochim Biophys Acta (BBA)* 2006, May-Jun;1761(5-6):599-617.

Kim, M.J.; Kim, H.S.; Lee, S.; Min, K.Y.; Choi, W.S.; You, J.S. Hexosamine Biosynthetic Pathway-Derived O-GlcNAcylation Is Critical for RANKL-Mediated Osteoclast Differentiation. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 8888. <https://doi.org/10.3390/ijms22168888>



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Graduação

Folha de Informação

Em consonância com a Resolução CoCEX-CoG nº 7.497/2018, informamos que a Comissão de Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) em sua 509ª Reunião Ordinária, realizada em 02 de maio de 2022, **aprovou**, fundamentando-se na sugestão da Subcomissão para Avaliação dos Trabalhos de Conclusão de Curso (TCCs) da Unidade, **a inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital de Trabalhos Acadêmicos da USP (BDTA).**

Cumpre-nos destacar que a disponibilização deste trabalho na BDTA foi autorizada pelos autores (estudante e docente orientador) no formulário de indicação de orientador (conforme anexo).

Ribeirão Preto, 22 de junho de 2022.

Prof. Dr. Michel Reis Messori
Presidente da Comissão de Graduação
FORP/USP

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Maria Cristina Borsato

Presidente da Subcomissão para Avaliação dos TCCs da FORP

FORMULÁRIO DE INDICAÇÃO DE ORIENTADOR(A)

<u>DADOS PESSOAIS</u>	
Nome: Eduardo Luiz Papa Villa	
Nº USP: 9898871	Período: 7
Telefone de contato: (16) 98161-7380	E-mail USP: eduardo.villa@usp.br
<u>INFORMAÇÕES SOBRE O TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO</u>	
Nome do Orientador(a): Profa. Sandra Yasuyo Fukada Alves	
Departamento: Ciências BioMoleculares	
Área de conhecimento: Farmacologia	
Subárea: Imunofarmacologia	
<u>MODALIDADE</u>	
Modalidade: Pesquisa Científica	
<u>ACEITE DO(A) ORIENTADOR(A)</u>	

Eu, Profa. Dra. Sandra Yasuyo Fukada Alves, aceito ser orientadora do aluno supracitado, comprometendo-me a orientar, acompanhar e avaliar o desenvolvimento de seu Trabalho de Conclusão de Curso em todas as suas etapas.

Declaramos ter pleno conhecimento do Regulamento dos Trabalhos de Conclusão de Curso da FORP, estando, portanto, cientes de que este TCC poderá ser incluído na Biblioteca Digital de trabalhos Acadêmicos (BDTA) da USP.



Eduardo Luiz Papa Villa



Profa Sandra Yasuyo Fukada Alves