

Research Report

Minyak ikan Lemuru (*Sardinella longicep*) menurunkan apoptosis osteoblas pada tulang alveolaris tikus wistar

(Fish oil of Lemuru (*Sardinella longicep*) reduced the osteoblast apoptosis in wistar rat alveolar bone)

Didin Erma Indahyani

Bagian Biologi Oral

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Jember - Indonesia

ABSTRACT

Background: Periodontal disease is caused by periodontopathogen bacteria resulting the alveolar bone damage. The decrease of osteoblasts and the increased of osteoclasts can cause bone destruction. The decrease of osteoblasts, due to a disturbance of differentiation, proliferation and apoptosis. Inflammatory mediators are prostaglandin E2 (PGE2), interleukin-1 (IL-1), IL-6 also tumor necrosis alpha (TNF- α) stimulates osteoblast apoptosis through gene expression, signaling molecules and receptor-forming osteoblasts. Fish oil of Lemuru, which is widely encountered in Indonesian coast, containing n-3 poly unsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) are quite high. Consumption of fish oil shown to reduce the expression of PGE2, IL-1, IL-6 and TNF- α . **Purpose:** The purpose of this study was to examine the effect of Lemuru (*Sardinella longicep*) fish oil on osteoblast apoptosis of rat alveolar bone induced periodontal infection. **Methods:** Thirty Wistar rats, male, age 5 days, divided into 3 groups: group I rats induced with normal saline, group II rats induced by LPS, and group III rats induced with lemuru fish oil and LPS. Each group was divided into 2 sub-groups that would be sacrificed at 13 days and 21 days of age. Fish oil was given at a dose 1ml/300-350 grams. Lipopolysaccharide (LPS) induced with the purpose to cause periodontal infection in the maxillary buccal fold molar region with dose 5 μ l LPS/PBS 0.03 ml. After decapitation and decalcification, the maxilla was cut in 5 μ m thickness. Apoptosis was analyzed on DNA and detected by TUNEL reaction (transferase-mediated digoxigenin-deoxy-UTP nick end labeling). **Results:** The results showed that apoptosis of osteoblast cells was significantly smaller in rats induced by Lemuru fish oil. **Conclusion:** The study showed that Lemuru fish oil reduced the osteoblast apoptosis of rats alveolar bone induced periodontal infection by LPS.

Key words: Fish oil, *Sardinella longicep*, osteoblast, apoptosis, n-3 PUFA, periodontal disease, bone resorption

ABSTRAK

Latar belakang: Penyakit periodontal akibat bakteri periodontopatogen, menyebabkan terjadinya kerusakan tulang alveolar. Penurunan jumlah osteoblas dan peningkatan jumlah osteoklas mengakibatkan kerusakan tulang. Penurunan jumlah osteoblas disebabkan terjadinya gangguan diferensiasi maupun proliferasi juga apoptosis. Apoptosis osteoblas dimodulasi oleh mediator-mediator inflamatori yaitu prostaglandin E2 (PGE2), interleukin-1 (IL-1), IL-6 juga tumor nekrosis alfa (TNF- α), melalui pengaruhnya pada ekspresi gen, molekul-molekul signaling maupun reseptor pembentukan osteoblas. Minyak ikan Lemuru yang banyak di pesisir Indonesia, banyak mengandung n-3 poly unsaturated fatty acid (n-3 PUFA). Konsumsi minyak ikan terbukti menurunkan ekspresi PGE2, IL-1, IL-6 maupun TNF alfa. **Tujuan:** Tujuan penelitian ini adalah untuk meneliti pengaruh minyak ikan Lemuru (*Sardinella longicep*) pada apoptosis osteoblas pada tulang alveolar tikus yang diinduksi infeksi periodontal. **Metode:** Tiga puluh ekor tikus Wistar, jantan, umur 5 hari, dibagi menjadi 3 kelompok yaitu: kelompok I tikus diinduksi dengan salin normal, kelompok II tikus diinduksi dengan lipopolisakarida (LPS), dan kelompok III tikus diinduksi dengan minyak ikan Lemuru dan LPS. Masing-masing kelompok dibagi menjadi

2 sub kelompok yaitu kelompok yang akan didekapitasi pada umur 13 hari dan umur 21 hari. Minyak ikan Lemuru diberikan dengan dosis 1ml/300-350 gram. Lipopolisakarida (LPS) diinduksikan dengan tujuan untuk menyebabkan infeksi periodontal pada buccal fold regio molar rahang atas, dengan dosis 5µl LPS/0,03PBS (konsentrasi 0,02 mg). Setelah didekapitasi dan dekalsifikasi, rahang atas dipotong dengan ketebalan 5µm. Apoptosis dianalisis pada DNA dan dideteksi dengan TUNEL reaction (Transferase-mediated digoxigenin-deoxy-UTP nick end labeling). **Hasil:** Hasil penelitian menunjukkan bahwa apoptosis sel osteoblas secara bermakna lebih kecil pada tikus yang diinduksi dengan minyak ikan. **Simpulan:** Penelitian ini menunjukkan bahwa minyak ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) mampu menurunkan apoptosis sel osteoblas pada tikus Wistar yang diinduksi infeksi periodontal dengan LPS.

Kata kunci: Minyak ikan, *Sardinella longiceps*, osteoblas, apoptosis, n-3 PUFA, penyakit periodontal, resorpsi tulang

Korespondensi (correspondence): Didin Erma Indahyani, Bagian Biologi Oral, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember. Jl. Kalimantan No. 35 Jember 68121, Indonesia. E-mail: didinerm@yaho.com

PENDAHULUAN

Apoptosis osteoblas merupakan komponen penting yang terlibat dalam osteogenesis secara normal dan patologis. Di dalam skeletal pada masa post natal dan dewasa, apoptosis merupakan bagian integral terhadap fisiologi *turnover* tulang, *repair* dan regenerasi. Keseimbangan proliferasi, diferensiasi dan apoptosis osteoblas menentukan ukuran populasi osteoblas pada waktu tertentu.¹ Tingkat pembentukan tulang ditentukan oleh jumlah osteoblas, replikasi progenitornya dan *life-span* dari sel yang matur. Hal tersebut dapat mencerminkan waktu kematian sel oleh apoptosis. Telah dibuktikan bahwa apoptosis menentukan jumlah osteoblas, maka perubahan dalam prevalensi apoptosis pada osteoblas dapat mengubah laju pembentukan tulang.²

Periodontopatogen menyebabkan inflamasi dan destruksi tulang alveolaris. Mekanisme destruksi tulang merupakan proses kompleks yang melibatkan 2 aksi sel osteoklas dan osteoblas. Pada proses inflamasi, sel pembentuk tulang yaitu osteoblas mengalami penurunan jumlah maupun aktivitasnya, sedangkan sel osteoklas akan meningkat. Penurunan jumlah sel osteoblas diakibatkan oleh berkurangnya proliferasi atau tingginya apoptosis osteoblas ataupun sel prekursor, yang keduanya dipengaruhi oleh adanya inflamasi.³ Peristiwa tersebut diawali adanya respon sistem imun alami yaitu *toll-like receptors* (TLRs) pada sel epitel gingiva mendeteksi dan merespon struktur mikroba misalnya *lipopolysaccharide* (LPS), *peptidoglycan*, DNA bakteri, *double-stranded RNA*, dan lipoprotein. Struktur mikroba tersebut dikenal dengan *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). TLRs yang terdapat di permukaan sel host, mengenali PAMPs, dan menyebabkan aktivasi beberapa faktor transkripsi yaitu *nuclear factor-κB* (NFκB) dan aktivator protein 1 (AP-1) melalui *mitogen-activated protein kinase* (MAK) *cascade*.⁴

Selain itu respon sistem imun alami, akan mengaktivasi sitokin proinflamatori, *chemokine* serta eikosanoid yang berperan penting pada apoptosis sel osteoblas. Sitokin pro-inflamatori, misalnya IL-1β dan TNF-α, secara langsung

menstimulasi apoptosis osteoblas ataupun prekursor osteoblas atau secara tidak langsung mempengaruhi stimulasi ekspresi Fas yaitu mediator proapoptosis yang potensial.⁵ Eikosanoid yaitu prostaglandin E-2 (PGE-2) berperan penting untuk menurunkan produksi osteoblas. PGE-2 menginduksi osteoblas memproduksi *receptor activated nuclear kappa-β ligand* (RANKL) dan menurunkan produksi *osteoprotegerin* (OPG). Selain itu PGE2 mempertinggi ikatan antara RANKL dan *receptor activated nuclear kappa-β* (RANK) pada prekursor osteoklas. Penurunan OPG yang berfungsi mengikat RANKL untuk membentuk osteoblas, mengakibatkan RANKL berikatan dengan RANK yang menyebabkan pembentukan osteoklas. Keadaan tersebut menyebabkan jumlah osteoblas menurun.⁶

Minyak ikan lemuru berasal dari ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) banyak di temukan di pesisir Indonesia, terutama pulau Jawa. Produksinya melimpah, sehingga harganya sangat murah. Selama ini ikan lemuru selain di buat minyak ikan juga di buat tepung ikan sebagai makanan ternak. Minyak ikan lemuru mengandung *n-3 polyunsaturated fatty acid* (PUFA) yaitu *eicosapentaenoic acid* 13,70% (EPA) dan *docohexanoic acid* (DHA) 8,91%.⁷

n-3 PUFA adalah prekursor eikosanoid yang terlibat dalam metabolisme tulang, yaitu prostaglandin (PG) dan *leukotrienes*. Diet EPA dan DHA akan mengganti n-6 PUFA dalam membran platelet, eritrosit, monosit dan sel hati. Ini berperan pada perubahan rasio n-6/n3 PUFA dalam membran yang menyebabkan terjadinya perubahan sifat dan fungsi. Perubahan ini berperan penting pada penurunan produksi IL-1, IL-6 dan TNF-alfa.⁸ Konsumsi n-3 PUFA menurunkan TNF-alpha. Penurunan sitokin proinflamatori maupun eikosanoid oleh karena n-3 PUFA, menyebabkan konsumsi minyak ikan akan menyebabkan terjadinya peningkatan pembentukan tulang, dan menurunkan destruksi tulang.⁹ Penelitian ini bertujuan untuk meneliti pengaruh minyak ikan lemuru pada apoptosis sel osteoblas pada tulang alveolar tikus wistar yang diinduksi infeksi periodontal.

BAHAN DAN METODE

Tiga puluh ekor tikus Wistar jantan, umur 5 hari, dibagi menjadi 3 kelompok yaitu: kelompok I tikus diinduksi dengan saline normal, kelompok II tikus diinduksi dengan LPS, dan kelompok III tikus diinduksi dengan minyak ikan lemuru (produksi Muncar Banyuwangi) dan LPS. Masing-masing kelompok dibagi menjadi 2 sub kelompok yaitu kelompok yang didekapitasi pada umur 13 hari dan umur 21 hari. Waktu dekapitasi 13 hari setelah induksi minyak ikan, saat baru terjadi pergantian n-6 PUFA dengan n-3 PUFA pada membran sel dan pada 21 hari saat pergantian asam lemak tersebut sudah berlipat.¹⁰

Minyak ikan lemuru diberikan dengan dosis 1ml/300-350 gram berat badan tikus wistar, secara peroral, menggunakan sonde lambung, dan diberikan tiap hari (yang dimulai 3 hari setelah induksi LPS) sampai tikus dilakukan dekapitasi. Induksi LPS selama 3 x 24 jam telah menyebabkan peningkatan jumlah osteoklas pada tulang alveolaris. Induksi LPS dilakukan di bukal *fold* regio molar rahang atas, dengan dosis 5µl LPS/0,03PBS (konsentrasi LPS 0,02 mg), yang dilakukan 24 jam sekali sebanyak 8 kali.¹¹ Tikus didekapitasi setelah berumur 13 dan 21 hari. Tikus yang telah didekapitasi diambil rahang atas kanannya, kemudian difiksasi dengan *Bouin's fixative* 4°C semalam. Spesimen didemineralisasi menggunakan asam asetat/formalin saline dan ditanam dalam blok parafin kemudian di potong dengan ketebalan 5µm. Spesimen dilakukan Fragmentasi DNA dan dideteksi dengan *Transferase-mediated digoxigenin-deoxy-UTP nick end labeling (TUNEL reaction)*, untuk menganalisa apoptosis sel osteoblas, yang secara singkat adalah sebagai berikut. Irisan dikonterstain dengan 3% *metil green*, kemudian diinkubasi selama 1-2 menit dengan 0,15% CuSO₄ dalam 0,9% NaCl. *TUNEL reactions* nampak pada nukleus sel dan sel yang nukleusnya nampak coklat gelap yang jelas adalah positif. *TUNEL reactions* yang positif adalah sel yang mengalami proses apoptosis.¹²

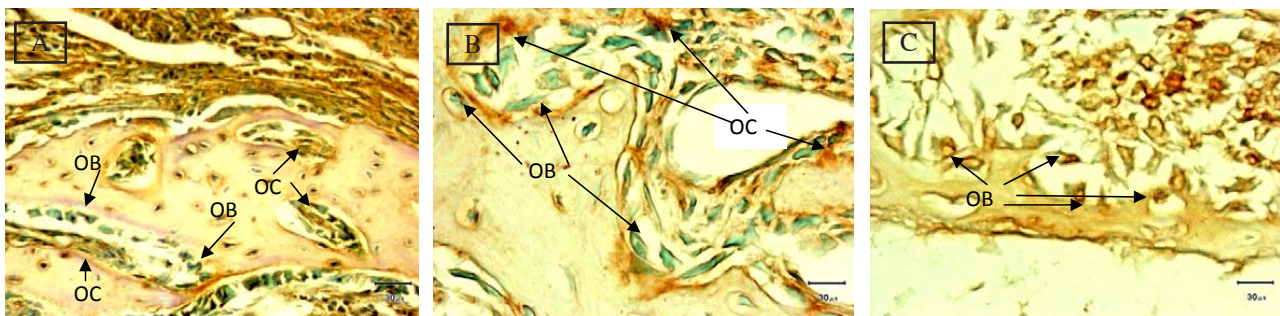
HASIL

Apoptosis osteoblas secara bermakna ($p < 0,05$) lebih besar pada tikus yang diinduksi LPS yang berumur 13 hari maupun 21 hari bila dibandingkan dengan kontrol. Tikus yang diinduksi LPS kemudian di beri minyak ikan mempunyai tingkat apoptosis yang lebih rendah secara signifikan ($p < 0,05$) pada umur 13 maupun 21 hari bila dibandingkan dengan kontrol (Tabel 1). Gambaran mikroskopis pada apoptosis osteoklas dan osteoblas dapat dilihat pada Gambar 1A, B, C.

PEMBAHASAN

Induksi LPS mengakibatkan apoptosis sel osteoblas pada tikus umur 13 hari maupun 21 hari. Sel osteoblas yang mengalami apoptosis lebih banyak secara signifikan pada tikus yang hanya di induksi LPS. LPS bersifat endotoksin karena LPS mengikat reseptor *cluster of differentiation 14 (CD14)* di permukaan sel makrofag dan monosit. *Toll-like receptor-4 (TLR4)* makrofag dan monosit yang berikatan dengan bakteri oleh karena adanya CD14 akan menginduksi sekresi sitokin dan *mediator lipid inflammation*. Sitokin dan mediator inflamasi tersebut termasuk IL-1, TNF- α juga PGE-2. Mediator tersebut berperan pada diferensiasi dan aktifitas osteoklas dan menekan jumlah osteoblas. Mediator tersebut memacu terbentuknya osteoklas dari sel stromal/osteoblas melalui ikatan sel ke sel yaitu RANKL dalam osteoblas dengan RANK pada progenitor osteoklas.¹³

Pemberian minyak ikan lemuru mengakibatkan peningkatan jumlah osteoblas secara signifikan (Tabel 1). Minyak ikan lemuru mengandung EPA dan DHA. Konsumsi minyak ikan tersebut mengakibatkan terjadi peningkatan komposisi EPA dan DHA serta rendahnya asam *arachidonat (AA)* dalam membran sel. Asam *arachidonat* adalah sumber utama pembentukan PGE₂, leukotrin, lipoksin dan p45 akibat terjadinya oksigenasi



Gambar 1. Gambaran apoptosis osteoblas, dengan TUNEL (pembesaran 1000x).

Keterangan: sel yang menunjukkan warna hijau merupakan sel yang *survive*, sedangkan sel yang berwarna coklat merupakan sel yang mengalami apoptosis. A. Tikus kontrol (tampak sel osteoblas dalam keadaan *survive*), B Tikus yang diinduksi LPS dan di beri minyak ikan (sel osteoblas terlihat lebih banyak yang *survive*). C, tikus yang diinduksi LPS (sel osteoblas banyak mengalami apoptosis). OB (osteoblas), OC (Osteoklas).

Tabel 1. Jumlah apoptosis sel osteoblas

	n	Apoptosis osteoblas	
		Mean	Std. Deviation
kontrol - 13 hari	5	1.80	.83
kontrol - 21 hari	5	1.20	1.30
LPS 13 hari	5	5.80	3.96
LPS 21 hari	4	10.00	5.22
LPS MI 13 hari	5	3.80	2.28
LPS MI 21 hari	5	2.60	2.70
Total	29	4.00	3.95

Keterangan: LPS: *lipopolysaccharide*, n: jumlah ulangan

oleh enzim-enzim lipoksigenase, siklooksigenase dan epoksigenase yang berasal dari n-6 PUFA.⁸ Konsumsi n-3 PUFA, selama 2 minggu mengakibatkan peningkatan α -linolenic acid (ALA) sebanyak 3-4 \times lipat, EPA 3 \times lipat dan DHA 1,5 \times lipat dalam membran sel. Peningkatan membran sel dengan n-3 PUFA tersebut menyebabkan penurunan produksi PGE2, tetapi akan meningkatkan PGE3 yang berfungsi sebagai anti inflamasi.¹³

Rendahnya PGE2 mempengaruhi pembentukan osteoblas, karena fungsi PGE2 yang menstimulasi ekspresi RANKL oleh prekursor osteoblas dan osteoblas matur akan menurun dan meningkatkan produksi OPG. OPG yang berikatan dengan RANKL berperan penting untuk terjadinya pembentukan osteoblas, akan tetapi apabila RANKL berikatan dengan RANK menyebabkan apoptosis osteoblas.⁸ n-3 PUFA mempengaruhi penurunan sitokin proinflamatori yaitu IL-1, IL-6 maupun TNF- α . Hal ini dihubungkan dengan penurunan aktivitas *antigen presenting cells* (APC), yaitu dengan berkurangnya ekspresi molekul *major histocompatibility cell* kelas II (MHC kelas II) dan *intercellular adhesion molecule* (ICAM). Ekspresi MHC kelas II diperlukan untuk berfungsinya APC, sedangkan ICAM merupakan molekul reseptor yang terdapat pada APC. Tanpa adanya MHC kelas II dan ICAM, APC tidak akan bisa aktif memapar antigen, misalnya LPS. APC yang aktif menstimulasi ekspresi sitokin proinflamatori. PGE-2, menyebabkan sitokin proinflamatori (IL-1 dan TNF- α) juga menurun. Penurunan sitokin proinflamatori berkaitan erat dengan penurunan jumlah osteoklas, dan peningkatan jumlah osteoblas. Sitokin proinflamatori bisa secara langsung menstimulasi apoptosis osteoblas dan prekursornya, atau secara tidak langsung dengan menstimulasi ekspresi Fas. TNF- α menginduksi apoptosis sel ligamen periodontal yang berperan sebagai sumber prekursor osteoblas. Apoptosis yang distimulasi oleh sitokin proinflamatori, mempengaruhi faktor transkripsi pro apoptosis yaitu *forkhead box-O1* (FOXO1).⁵ FOXO1 meregulasi ekspresi gen proapoptosis yaitu *Fas-associated, via death domain* (FADD) dan *caspases-3, -8, and -9*. Peranan MAP kinase mempengaruhi *signal pro inflamatori*.¹⁴ *Upstream regulators p38 MAP kinase*, MKK3 and MKK6, diperlukan IL-1beta dan TNF-

α menginduksi ekspresi *RANK ligand* dalam *stromal bone marrow*.³ n-3 PUFA berperan menurunkan Fas melalui penurunan TNF- α , yang mempengaruhi transkripsi gen apoptosis dan menurunkan ekspresi RANKL akibat stimulasi dari IL-1 dan TNF- α .

Lipopolisakarida di ketahui berperan penting pada apoptosis osteoblas. Lipopolisakarida menginduksi osteoblas untuk mengekspresikan NOD1 dan NOD2, yaitu dua kelompok *nucleotide-binding domain* dan *leucine-rich repeat region* yang mengandung kelompok protein reseptor biasa disebut NLRs, yang bertindak sebagai sensor intraselular untuk bakteri peptidoglikan dan menginisiasi produksi mediator proinflamatori. *NLR family CARD domain* yang terdiri dari 4 (NLRC4, yang saat ini dikenal sebagai Ipaf, Card12, atau CLAN) dan *NLR family pyrin domain* yang terdiri dari 3 (NLRP3, yaitu dikenal sebagai CIAS1, cryopyrin, PYPAF1, atau NALP3) telah diimplikasikan dalam menginduksi kematian sel dalam merespon bakteri dan komponennya.^{15,16} Kedua molekul tersebut dapat berhubungan dengan protein adaptor yaitu *apoptosis-associated speck-like protein* (ASC) untuk menstimulasi aktivasi *caspase-1* and *caspase-8* yaitu enzim yang menunjukkan peningkatan aktivitas osteoblas setelah terinduksi bakteri. Aktivasi *caspase-1* dan *caspase-8* menginduksi apoptosis osteoblas.^{17,18}

Apoptosis osteoblas juga diakibatkan meningkatnya produksi *nitric oxide* (NO) akibat induksi lipopolisakarida. Lipopolisakarida dan sitokin proinflamatori, terbukti menstimulasi peningkatan iNOS. Kuzushima, dkk.,¹⁹ menyatakan bahwa TNF- α , interleukin-1 β and interferon- γ menyebabkan kematian sel osteoblas yang di mediai oleh apoptosis bukan nekrosis. Sitokin terbukti menghasilkan peningkatan *inducible nitric-oxide synthase* (iNOS) mRNA dan *nitric-oxide* (NO) dalam sel.¹⁹ NO menginduksi apoptosis osteoblas melalui *synthesis Bax protein*.²⁰

Selain itu NO menyebabkan penekanan pada viabilitas sel, potensial membran mitokondria dan sintesis ATP, yang mengakibatkan gangguan pada fungsi mitokondria, reaksi spesies oksigen intraseluler dan protein Bcl-2 yang berperan penting pada apoptosis osteoblas.²¹ Rendahnya sitokin tersebut berperan untuk menghambat pembentukan NO yang tinggi dan juga menghambat stimulasi kelompok protein reseptor yaitu NLRs yang berperan pada apoptosis osteoblas.¹⁰ n-3 PUFA yang berperan pada penurunan ekspresi sitokin proinflamatori dan eikosanoid, berpengaruh pada penurunan ekspresi iNOS.²²

Penelitian ini menunjukkan bahwa minyak ikan lemuru dengan kandungan n-3 PUFA dengan kandungan 12,5% n-3 PUFA yaitu EPA dan DHA menurunkan apoptosis sel osteoblas pada tikus Wistar yang diinduksi LPS.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada pemberi dana untuk pelaksanaan penelitian ini yaitu DP2M Dikti pada penelitian fundamental.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hock JM, Krishnan V, Onyia JE, Bidwell JP, Milas J, Stanislaus D. Osteoblast apoptosis and bone turnover. *J Bone Miner Res* 2001; 16(6): 975-84.
2. Robert LJ, Robert S, Weinstein TB, Paula RA, Michael P, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest* 1999; 104: 439-46.
3. Graves DT, Li J, Cochran DL. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res* 2011; 90(2): 143-53.
4. Benedetto AD, Gigante I, Colucci S, Maria G. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clin and Develop Immunol* 2013: 7.
5. Behl Y, Siqueira M, Ortiz J, Li J, Desta T, Faibish D. Activation of the acquired immune response reduces coupled bone formation in response to a periodontal pathogen. *J Immunol* 2008; 181: 8711-18.
6. Kotake S, Toru Y, Manabu K, Yuki N. Effects of NSAIDs on differentiation and function of human and murine osteoclasts—crucial ‘human osteoclastology’. *Pharmaceuticals* 2010; 3: 1394-410.
7. Estiasih T. Mikroenkapsulasi konsentrat asam lemak omega 3 dari limbah cair pengalangan ikan lemuru. Tesis. Yogyakarta: Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada; 1996. h. 12-6.
8. Kajarabille N, Diaz-Castro J, Hijano S, López-Frías M, López-Aliaga I, Ochoa JJ. A new insight to bone turnover: role of ω -3 polyunsaturated fatty acids. *The Sci World J* 2013: 16.
9. Mahmoud MAA, Safar MM, Agha AM, El-shabrawy OAM, Yassin NAZ. Effect of linseed oil, fish oil and alendronate sodium on ovariectomy-induced osteoporosis in female rats. *J of Appl Sci Res* 2013; 9(3): 2119-125.
10. Montzioris E, Cleland LG, Gibson AR, Neumann MA, Demasi M, James MJ. Biochemical effects of a diet containing foods enriched with n-3 fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 42-8.
11. Indahyani DE, Santoso ALS, Utoro T, Soesatyo MH. Lipopolysaccharide (LPS) introduction during growth and development period of rat's tooth toward the occurrence of enamel hypoplasia. *Dent J (Maj Ked Gigi)* 2007; 40(2): 85-8.
12. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt M, Manolagas SC, Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt M, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblast and osteocytes by glucocorticoids. *J Clin Invest* 1998; 102: 274-82.
13. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999; 20(3): 345-57.
14. Rogers JE, Li F, Coatney DD, Otremba J, Kriegl JM, Protter TA. A p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor arrests active alveolar bone loss in a rat periodontitis model. *J Periodontol* 2007; 78: 1992-98.
15. Gumucio DL, Diaz A, Schaner P, Richards N, Babcock C, Schaller M, Cesena T. Fire and ICE: The role of pyrin domain-containing proteins in inflammation and apoptosis. *Clin Exp Rheumatol* 2002; (Suppl 26): S45–S53.
16. Sutterwala FS, Ogura Y, Szczepanik M, Lara-Tejero M, Lichtenberger GS, Grant EP, Bertin J, Coyle AJ, Galan JE, Askenase PW, Flavell RA. Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity* 2006; 24: 317–27.
17. Mariathasan S. ASC, Ipaf and Cryopyrin/Nalp3: bonafide intracellular adapters of the caspase-1 inflammasome. *Microbes Infect* 2007; 9: 664–71.
18. McCall SH, Sahraei M, Young AB, Worley SC, Duncan JA, Pan-Yun Ting J, Marriott I. Osteoblasts express NLRP3, a nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat region containing receptor implicated in bacterially induced cell death. *J bone and min Res* 2008; 23: 1.
19. Kuzushima M, Mogi M, Togari A. Cytokine-induced nitric-oxide-dependent apoptosis in mouse osteoblastic cells: Involvement of p38MAP kinase. *Arc of Oral Biol* 2006; 51(11): 1048-53.
20. Mungrue LN, Bredt DS, Stewart DJ, Husain M. From molecules to mammals: what's NOS got to do with it. *Acta Physiol scand* 2003; 179: 123-35.
21. Rueti-Ming Chen, Ta-Liang Chen, Wen-Ta Chiu, Chia-Chen Chang. Molecular mechanism of nitric oxide-induced osteoblast apoptosis. *J of Orth Res* 2005; 23(2): 462–68.
22. Sargi SC, Dalalio MMO, Moraes AG, Visentainer JEL, Morais DR, Visentainer JV. Role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the production of prostaglandin E2 and nitric oxide during experimental murine paracoccidiodomycosis. *BioMed Res Int* 2013: 6.