



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

JOÃO ANTONIO CHAVES DE SOUZA

Estudo da Participação de reguladores negativos endógenos da
atividade de STAT1 e STAT3 (SOCS1 e SOCS3) na doença
periodontal experimental

ARARAQUARA

2010



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

JOÃO ANTONIO CHAVES DE SOUZA

Estudo da Participação de reguladores negativos endógenos da
atividade de STAT1 e STAT3 (SOCS1 e SOCS3) na doença
periodontal experimental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Odontologia – Área de Periodontia, da Faculdade de
Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual
Paulista, para o título de Mestre em Odontologia.

Orientador: *Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli*

Co-orientadores: *Prof. Dr. Carlos Rossa Junior*

ARARAQUARA

2010

JOÃO ANTONIO CHAVES DE SOUZA

**Estudo da Participação de reguladores negativos endógenos da
atividade de STAT1 e STAT3 (SOCS1 e SOCS3) na doença
periodontal experimental**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

2º Examinador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

3º Examinador: Prof. Dr. Paulo Sergio Cerri

Araraquara, 30 de março de 2010.

DADOS CURRICULARES

JOÃO ANTONIO CHAVES DE SOUZA

NASCIMENTO: 20.08.1983 - São Miguel do Oeste/SC

FILIAÇÃO: Emanuel de Souza
Maria Pinheiro de Souza Chaves

2002 - 2006: Curso de Graduação
Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP

2008: Curso de Pós-Graduação em Periodontia
Nível: Mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Emanuel (*in memoriam*) e à minha mãe Maria pela inspirações, amizade, ensinamentos de vida e por todo o amor e preocupação. Obrigado por caminhar sempre ao meu lado.

Aos meus irmãos: Daquina, Bige, Pedro, Nel e Mariana pelo amor, amizade e a participação em todos os momentos de alegria e tristeza.

À minha namorada Cris, pelo amor, amizade e companheirismo durante os últimos 4 anos. Você, seus pais, irmãs e sua sobrinha Pietra são como minha família em Araraquara.

Aos meus cunhados André e Luiz, que também considero como irmãos.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Joni Augusto Cirelli, Carlos Rossa Junior e Gustavo Garlet pelos ensinamentos e ajuda na realização desse trabalho.

Aos amigos Andres, Betão, Carlos, Faeda, Guilherme, Ishi, Lucas, Popotinha, Rubão e Rafa Calixto agradeço a amizade e momentos de descontração.

À Andressa pela amizade e por ter sido responsável por grande parte da realização desse trabalho.

À Regina Lúcia pelo carinho, ajuda e amizade nesses 2 anos de convivência.

Aos professores, funcionários e colegas que fazem parte do Curso de Pós-graduação em Odontologia (Periodontia) da Faculdade de Odontologia de Araraquara.

À Mara e aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pela atenção e disponibilidade.

Aos funcionários da Biblioteca pela atenção e disponibilidade.

À CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro, sem o qual não poderia realizar esse trabalho.

SUMÁRIO

Resumo.....	7
Abstract.....	10
1 Introdução.....	13
2 Revisão da Literatura.....	16
3 Proposição.....	27
4 Material e Método.....	29
5 Resultado.....	47
6 Discussão.....	63
7 Conclusão.....	72
8 Referências.....	74
9 Anexos.....	86

RESUMO

Souza JAC. Estudo da participação de inibidores negativos endógenos da atividade de STAT1 e STAT3 (SOCS1 e SOCS3) na doença periodontal experimental [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

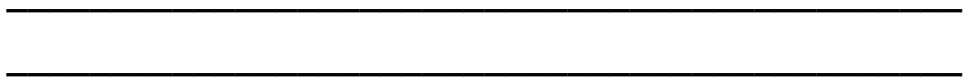
RESUMO

A expressão de citocinas inflamatórias é um processo estritamente regulado por mecanismos variados, incluindo o controle da sinalização intracelular e da atividade transcricional por inibidores endógenos, os quais são pouco estudados e compreendidos. Três grupos de proteínas: SHP, PIAS e SOCS inibem de maneira distinta e específica a transdução de sinais pela via JAK/STAT, bem como a atividade dos fatores de transcrição, eventos que modulam a expressão de diversas citocinas. As doenças periodontais estão associadas à inflamação persistente, com elevados níveis de citocinas proinflamatórias, no entanto praticamente não existem informações sobre a participação destes mecanismos de regulação nas diferentes condições clínicas periodontais. Os objetivos deste projeto incluíram avaliar a cinética de expressão das proteínas SOCS1 e SOCS3 e suas proteínas-alvo, STAT1 e STAT3, respectivamente, durante a evolução da doença periodontal. Foram utilizados 36 ratos Wistar divididos em 2 grupos: DP - doença periodontal induzida por 2 métodos: ligaduras ao redor dos 1^{os} molares inferiores e injeções de 60 µg de LPS de *E. coli* no tecido gengival palatino dos molares superiores, 3x/semana; Grupo controle negativo - recebeu apenas injeções de PBS (veículo). Os ratos foram

sacrificados 7, 15 e 30 dias após a indução da doença periodontal para avaliação histológica e análise macroscópica da perda óssea alveolar. A expressão de SOCS1 e SOCS3 e a ativação de STAT1 e STAT3 foram avaliadas nas biópsias gengivais por PCR em tempo real e Western blot. Ambos os modelos apresentaram significativa e progressiva perda óssea dos 7 aos 30 dias. A inflamação foi evidente já no período de 7 dias em ambos os modelos, porém enquanto manteve-se similar nos demais períodos no modelo de indução por LPS, apresentou uma diminuição na severidade da inflamação no modelo de ligadura aos 30 dias. Houve um significativo ($p < 0.05$) aumento na expressão gênica de SOCS1 e SOCS3 no grupo DP comparado com o grupo controle aos 15 dias (ambos os modelos) e aos 30 (modelo de indução por ligadura). A ativação de STAT1 e -3 foram aumentadas nos períodos iniciais no modelo por ligadura e nos períodos mais tardios no modelo de LPS. Estes resultados sugerem que SOCS1 e -3 participam na regulação do processo inflamatório responsável pela destruição periodontal.

Palavras-chave: Transdução de sinal; fatores de transcrição STAT; janus quinases; proteínas supressoras da sinalização de citocina; doenças periodontais; ratos

ABSTRACT



Souza JAC. Role of endogenous negative regulators of STAT1 and STAT3 (SOCS1 and SOCS3) during experimental periodontal disease [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

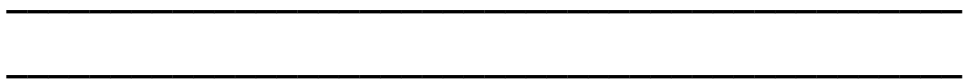
ABSTRACT

Inflammatory cytokine gene expression is a process strictly regulated by various mechanisms, including the negative regulation of signaling of cytokine receptors and of the activity of transcription factors such as STATs. These mechanisms involve endogenous proteins and are largely unknown, especially in periodontal diseases. Three groups of proteins, SHP, PIAS and SOCS modulate in a fairly specific manner JAK/STAT signaling and/or STAT activity. Periodontal diseases are infectious-inflammatory conditions of the supporting tissues of the teeth associated with increased levels of proinflammatory cytokines, but there are no information regarding the role of these endogenous mediators of JAK/STAT during its course. The aims of this study included the evaluation of the expression kinetics of inducible negative regulators and their target proteins during the course of experimentally induced periodontal disease. 36 Wistar rats were divided into two groups: PD - experimental periodontal disease induced by two methods: ligature placement around the first mandibular molars and *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) injections into the palatal gingival tissues of the maxillary molars, 3x/week, and Negative Control group. Rats were sacrificed 07, 15 and 30 days after disease induction for histological evaluation of periodontal

inflammation and macroscopic analysis of alveolar bone loss. SOCS expression and the activation status of STAT1 and STAT3 were evaluated in gingival biopsies by real time PCR and Western Blot. Both disease models presented significant progressive bone loss from 7 to 30 days. Inflammation was evident and similar for all the periods in LPS injected sites; however, a decrease on severity at the end of the experimental period was observed in the ligature model. There was a significant ($p < 0.05$) increase on SOCS1 and SOCS3 gene expression in PD compared to control group at 15 (both disease models) and 30 days (ligature-induced model). The activation of STAT1 and STAT3 were increased in earlier periods in the ligature model and in later periods in the LPS model. This study suggests that SOCS 1 and 3 participate in the regulatory mechanism of the inflammatory process responsible for the periodontal disease destruction.

Keywords: Signal transduction; STAT transcription factors; janus kinases; suppressor of cytokine signaling proteins; periodontal disease; rats

INTRODUÇÃO



INTRODUÇÃO

A doença periodontal caracteriza-se por processos que culminam na degradação de tecido conjuntivo e ósseo, e é resultado da reação imune/inflamatória em resposta à agressão gerada pelos microrganismos do biofilme dental¹². Sendo assim, a progressão da doença é decorrente de um desequilíbrio no processo dinâmico saúde-doença entre a microbiota periodontopatogênica e a resposta do hospedeiro frente à agressão²⁵. Esta resposta pode ocorrer diretamente, por meio da liberação de toxinas e produtos do metabolismo microbiano, ou de forma indireta por intermédio da indução de resposta imune/inflamatória no hospedeiro, com a produção e liberação de diversos mediadores e subsequente dano tecidual^{41,62}. O balanço entre os mediadores proinflamatórios e anti-inflamatórios determina a severidade da doença periodontal. Esta afirmação é suportada por diversos estudos que demonstram que enquanto elevados níveis de citocinas proinflamatórias como IL-6, TNF- α , RANKL e citocinas do tipo Th1 (como INF- γ) estão associados à doença periodontal severa, o efeito oposto acontece com citocinas do tipo Th2 (como IL-4 e IL-10)^{27,33}.

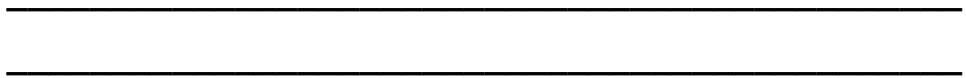
A complexa rede de citocinas estabelecida com a reação inflamatória associada à doença periodontal pode ativar uma série de vias de sinalização, responsáveis pela transmissão do sinal gerado pela ligação das citocinas a um receptor específico, e que por sua vez podem gerar resposta celular²⁰. Muitas das citocinas relevantes na destruição periodontal como interleucinas e interferons

sinalizam pela via JAK/STAT. Mecanismos intracelulares específicos asseguram o controle negativo da sinalização dessas citocinas por essa via. Um dos grupos de proteínas capazes de controlar a sinalização pela via JAK/STAT são as proteínas da família SOCS^{54,69}.

Dados na literatura demonstram que SOCS interfere na sinalização de LPS (lipopolissacarídeo), um dos responsáveis por iniciar a cascata inflamatória que culmina na doença periodontal^{4,41}. Além disso, estas proteínas mediam a inibição de diversas citocinas com atividade próinflamatória e antiinflamatória. Estudos *in vivo* demonstram a presença de SOCS, em especial SOCS1 e -3 em sítios periodontais doentes, sugerindo sua participação na progressão e severidade dessa doença²¹.

As doenças periodontais estão associadas à inflamação persistente, com elevados níveis de citocinas próinflamatórias, no entanto praticamente não existem informações sobre a participação dos mecanismos de regulação nas diferentes condições periodontais. Estudos que avaliem os mecanismos intracelulares de controle da sinalização de citocinas são importantes para o melhor entendimento da doença periodontal assim como de outras doenças crônicas inflamatórias.

REVISÃO DA LITERATURA



REVISÃO DE LITERATURA

Mecanismos endógenos de regulação da sinalização de citocinas inflamatórias

Diversas condições de natureza inflamatória ou infecciosa estão associadas ao aumento da expressão de citocinas e outros mediadores proinflamatórios. A síntese e expressão destes mediadores ocorrem de forma transitória e estritamente controlada visando à resolução do problema e restabelecimento da homeostase, sendo que a expressão exagerada e/ou descontrolada destas citocinas está associada a patologias importantes, como o câncer, doenças auto-imunes e crônicas (Johnston, O'Shea³², 2003).

A doença periodontal crônica é uma destas patologias crônicas, constituindo-se numa infecção mista em que a resposta do hospedeiro aos microrganismos do biofilme dental está associada a elevados níveis de citocinas proinflamatórias, resultando em uma cascata de eventos que culmina na degradação de tecido conjuntivo e ósseo (Cochran¹², 2008; Graves²⁶, 2008). Existem similaridades nas características e patogênese da artrite reumatóide e da doença periodontal (Bartold et al.⁵, 2005) tornando a última um modelo interessante para o estudo dos mecanismos de destruição tecidual associados à superexpressão de mediadores inflamatórios.

A doença periodontal se caracteriza pela presença de complexa rede de citocinas, as quais podem ter efeitos autócrinos ou parácrinos, podendo modular sua própria expressão ou a expressão de outras citocinas. Esta modulação

e regulação da expressão gênica das citocinas e mediadores inflamatórios pode ocorrer em múltiplos níveis. Um mecanismo relativamente pouco conhecido, mas relevante na expressão de citocinas inflamatórias e, principalmente, no controle de seus efeitos sobre a biologia celular é o controle da sinalização intracelular iniciada pela ligação entre as citocinas inflamatórias e seus receptores específicos (Gibson, Genco²⁴, 2007; Kirkwood, Rossa³⁶, 2009). Estes mecanismos de controle da expressão de citocinas e de seus efeitos biológicos têm gerado grande interesse recentemente não apenas pela elucidação do mecanismo de regulação da expressão gênica, mas também em virtude das possibilidades de utilização das proteínas envolvidas como potenciais alvos para a modulação terapêutica desta expressão (Kirkwood et al.³⁵, 2007).

As citocinas inflamatórias têm diversos, importantes e distintos efeitos biológicos. A geração destes efeitos biológicos depende da interação da citocina com um receptor de membrana específico presente na célula-alvo. Após esta interação citocina-receptor, a porção citoplasmática do receptor sofre alterações e inicia-se uma complexa cascata de eventos, usualmente mediados por reações seqüenciais e reversíveis de fosforilação de enzimas (quinasas) citoplasmáticas. Esta seqüência de eventos de fosforilação protéica é decorrente da transmissão de um sinal extracelular (a presença da citocina) pelo citoplasma da célula que pode culminar com a ativação de proteínas conhecidas como fatores de transcrição, as quais têm a capacidade de se ligar a seqüências de nucleotídeos específicos no DNA genômico, iniciando a transcrição gênica e, assim, finalmente estabelecendo

a resposta da célula à ligação entre a citocina presente no meio extracelular e seu receptor de membrana específico (Rakesh, Agrawal⁵⁴, 2005).

Classicamente, citocinas como as interleucinas e interferons ativam enzimas denominadas Janus kinases (JAKs) associadas à porção citoplasmática de receptores de membrana, levando à fosforilação de regiões (domínios) específicos destes receptores e também à ativação de seus substratos, em especial as proteínas conhecidas como STATs (*signal transducers and activators of transcription*), consideradas uma família de proteínas fundamental para a transdução de sinais gerados por citocinas (Starr, Hilton⁶³, 1999). Estas proteínas são também fundamentais para outros eventos importantes na biologia celular, como proliferação celular e apoptose (Blank et al.⁶, 2009; Hirano et al.³⁰, 2000). Por exemplo, a ligação de interferon gamma (IFN- γ) com seu receptor específico leva à ativação de JAK1 e JAK2, as quais induzem a fosforilação (ativação) principalmente de STAT1, enquanto que a sinalização iniciada por interleucina (IL)-6 resulta na ativação preferencial de STAT3, via JAK (Briscoe et al.¹⁰, 1996; Howlett et al.³¹, 2009).

Pelo fato de citocinas serem proteínas secretadas e se ligarem a receptores específicos que transduzem seu sinal e mediam suas funções, mecanismos rigorosos são necessários para assegurar o controle negativo da resposta celular iniciada pelas citocinas. Três grupos de proteínas SHP (*SH₂-containing phosphatases*), PIAS (*proteins inhibitors of activated STATs*) e SOCS (*supressors of cytokine signaling*) inibem de maneira distinta e específica a transdução do sinal (Wormald, Hilton⁶⁹, 2004).

Supressoras da sinalização de citocinas (SOCS)

A descoberta da família de proteínas denominadas supressoras da sinalização de citocinas (SOCS) proporcionou uma possível explicação para a regulação negativa da via JAK/STAT, sendo considerada relacionada à transitoriedade da expressão gênica e/ou função biológica das citocinas inflamatórias (Alexander, Hilton², 2004; Starr, Hilton⁶³, 1999). É importante ressaltar que estas proteínas SOCS, reguladoras negativas da sinalização de citocinas inflamatórias são induzidas pelas próprias citocinas inflamatórias, representando um mecanismo de regulação negativa por “*feedback*”. Existem oito proteínas da família SOCS, sendo as mais estudadas e melhor caracterizadas as SOCS1, -2 e -3. Estruturalmente, SOCS1 e -3 possuem uma região N-terminal, que contém uma região inibidora de kinase (*KIR - Kinase Inhibitory Region*), um domínio central SH2 (*Src homology 2*) e uma região C-terminal altamente conservada denominada (*SOCS Box*). Cada uma dessas estruturas bioquímicas relaciona-se intimamente com os mecanismos de ação inibitórios de SOCS (Boyle et al.⁹, 2009). O domínio SH2 além de determinar a especificidade da ligação de SOCS com sua proteína alvo liga-se aos resíduos de tirosina fosforilados (ativados) de receptores de citocinas, ou às próprias JAKs. Os mecanismos responsáveis pela atenuação do sinal (inibição da atividade de kinase das JAKs impedindo a ativação das STATs) ainda permanecem incertos, embora tenha sido proposto que esta inibição seja mediada pela região inibidora de kinases (Figura 1) (Kubo et al.³⁸, 2003; Nicholson et al.⁴⁹, 2000; Sasaki, Yasukawa⁵⁹, 1999).

Outras possíveis formas de regulação são mediadas por SOCS Box e incluem a interação direta com STATs e outras quinases intracelulares envolvidas na transdução de sinais, iniciando a ubiquitinação e degradação destas proteínas sinalizadoras/fatores de transcrição pelo proteassomo (Murray⁴⁶, 2006).

Individualmente, SOCS são capazes de inibir múltiplas citocinas, porém não está claro como essa inibição é regulada (Naka et al.⁴⁷, 2005; Rakesh, Agrawal⁵⁴, 2005). SOCS1 pode ser induzido por inúmeras citocinas que atuam pela via JAK/STAT incluindo TNF- α , IL-6 e IFN- γ e inibe a superexpressão dessas citocinas (Alexander, Hilton², 2004; Morita et al.⁴⁵, 2000; Starr et al.⁶⁴, 1997) SOCS3, induzido por IL-1, IL-6 e IFN- γ , parece atenuar o sinal inflamatório dessas citocinas (Alexander, Hilton², 2004; Bode et al.⁷, 2001; Rakesh, Agrawal⁵⁴, 2005). A deficiência de SOCS1, por deleção gênica, resulta em inflamação e destruição tecidual severa levando a uma síndrome inflamatória letal como consequência da desenfreada sinalização de IFN- γ (Alexander, Starr³, 1999; de Hooge et al.¹⁶, 2004; Egan et al.¹⁷, 2003). Já a deleção de SOCS3, em camundongos, é letal em estágio embrionário devido a defeitos placentários resultantes da desregulada sinalização de LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) (Roberts et al.⁵⁵, 2001).

Além de seu papel como reguladores negativos de citocinas inflamatórias, as quais estão elevadas na doença periodontal, considerando a natureza infecciosa desta doença, o envolvimento de SOCS1 e -3 na resposta celular a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS – *pathogen-associated molecular patterns*) é de especial interesse, pois sugere um papel

relevante para estas proteínas na resposta imune inata. Este fato é suportado por estudos com modelos animais deficientes em SOCS1 que se mostram hipersensíveis ao LPS microbiano, com choque séptico *in vivo*, enquanto *in vitro* observou-se que macrófagos derivados de animais deficientes em SOCS1 estimulados por LPS apresentaram aumento significativo na expressão de mediadores inflamatórios, incluindo fator de necrose tumoral (TNF), IL-12 e óxido nítrico (NO) (Kinjyo et al.³⁴, 2002; Nakagawa et al.⁴⁸, 2002). Estes dados indicam que SOCS1 tem efeito regulador negativo não apenas na via JAK/STAT de sinalização, mas também na via TLR-NF- κ B (receptor semelhante ao Toll-fator nuclear kappa B).

Já SOCS3 tem ação inibitória específica sobre STAT3, sendo, portanto um regulador negativo específico para citocinas que sinalizam via receptor de membrana gp130, como IL-6, leukemia inhibitory factor (LIF) e Oncostatin-M (OsM). De forma interessante, a produção de SOCS3 por macrófagos *in vitro* é induzida tanto por IL-6 quanto por IL-10, no entanto SOCS3 suprimiu seletivamente a sinalização induzida por IL-6 via receptor gp130, não afetando a sinalização da IL-10 via seu receptor específico (Yasukawa et al.⁷⁰, 2003) A relevância de SOCS3 em situações patológicas mediadas por IL-6 ou citocinas que sinalizam pelo mesmo receptor (gp130) e por STAT3 é demonstrada por estudos *in vivo* em modelos animais de artrite reumatóide nos quais a expressão forçada de SOCS3 ou de formas mutadas dominantes negativas de STAT3 preveniram o desenvolvimento da doença (Shouda et al.⁶¹, 2001).

Assim, SOCS3 pode ser considerado um regulador negativo de doenças inflamatórias, especialmente nas patologias associadas a elevados níveis de IL-6.

Estudos preliminares em pacientes com gengivite e periodontite crônica revelaram aumento na expressão de SOCS1 e -3 quando comparados a controles sem a doença. Acredita-se que este aumento está envolvido com a regulação negativa da sinalização de citocinas inflamatórias e, portanto, na atenuação da reação inflamatória e na severidade das doenças periodontais (Garlet et al.²¹, 2006)

As funções de SOCS1 e -3 podem, no entanto, não se restringirem à inibição da inflamação, mas se estendem à regulação do *turnover* do tecido ósseo. Evidências para este papel de SOCS1 e -3 estão relacionadas à demonstração que RANKL (*receptor-activator of nuclear factor kappa B ligand*), citocina considerada essencial e necessária à osteoclastogênese, estimula a produção de SOCS1 e -3 em células precursoras de osteoclastos. SOCS interferem com a ativação de STATs e, assim, inibem a sinalização de interferon (IFN), também induzido por RANKL nestas células, o qual atua como inibidor da diferenciação osteoclástica. Assim, as proteínas SOCS agem “retirando a atividade inibitória” dos IFNs sobre a osteoclastogênese induzida por RANKL em células precursoras de osteoclastos (Hayashi et al.²⁹, 2002). De fato, a supressão da expressão de SOCS1 ou -3 inibe significativamente a osteoclastogênese induzida por LPS microbiano e IL-6 (Ohishi et al.⁵³, 2005) sugerindo um papel complexo para as proteínas SOCS na regulação da sinalização de citocinas inflamatórias.

Evidências sugerem que, além de JAK/STAT, múltiplas vias de sinalização estão envolvidas na indução da expressão de SOCS. Essas vias participam da sinalização intracelular iniciada por LPS (Bode et al.⁸, 1999; Crespo et al.¹³, 2000; Niemand et al.⁵⁰, 2003; Stoiber et al.⁶⁵, 1999), TNF- α (Bode et al.⁷, 2005), IL-1 (Ahmed, Ivashkiv¹, 2000), fatores de crescimento de fibroblastos (Terstegen et al.⁶⁶, 2000) e CPG-DNA bacteriano (Dalpke et al.¹⁴, 2001). Nesse contexto a expressão de SOCS3 pode ser induzida por diferentes estímulos e vias de sinalização celular, particularmente por ERK (extracellular signal-regulated kinase) e p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) como demonstrado *in vitro* em diferentes linhagens de celulares (Caruso et al.¹¹, 2009; Madonna et al.⁴², 2008).

p38, da família das MAPKs, é fortemente ativada por produtos bacterianos como LPS e CpG e por citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL1- β e sua ativação é crucial para resposta celular e produção de citocinas inflamatórias (Roux, Blenis⁵⁷, 2004). Esta via de sinalização tem papel na regulação da expressão gênica de citocinas por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais, incluindo o controle da tradução e estabilidade do RNAm. Em contraste à ativação de mecanismos transcricionais por IL-6, TNF- α aumenta a expressão de SOCS3 pela estabilização de seu RNAm. A ativação da via p38 MAPK é necessária para a estabilização do RNAm de SOCS3 após estímulo com TNF- α e, conseqüentemente, aumento da expressão protéica. Em fibroblastos e macrófagos deficientes de um dos substratos da p38 MAPK, a MK2 (*MAPK-activated protein kinase 2*), a expressão basal de SOCS3 é reduzida, e a indução

da estabilização do RNAm de SOCS3 por TNF- α é impedida, indicando o papel da via p38 MAPK e de seu substrato MK2 na regulação da expressão SOCS3 (Ehrling et al.¹⁸, 2007).

Em resumo, a modulação da atividade de STAT1 e STAT3 por mecanismos regulatórios endógenos representados pelas proteínas SOCS pode afetar a expressão de diversos genes com atividade pró-inflamatória e, portanto, associados à destruição tecidual observada em condições inflamatórias como as doenças periodontais.

Considerando a ausência de informações relativas ao papel destes mecanismos reguladores negativos da expressão de citocinas inflamatórias nas doenças periodontais e também que esta é considerada modelo interessante para outras condições associadas à inflamação persistente, como a artrite reumatóide, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de SOCS1, SOCS3 na modulação da sinalização da via JAK/STAT em modelo de doença periodontal induzido em animais.

A partir do entendimento da cinética de expressão e atuação de SOCS durante a evolução da doença periodontal inflamatória, estudos futuros poderão ser direcionados ao entendimento de mecanismos envolvidos no controle da expressão gênica de SOCS por antígenos bacterianos e citocinas inflamatórias.

JAK/STAT pathway

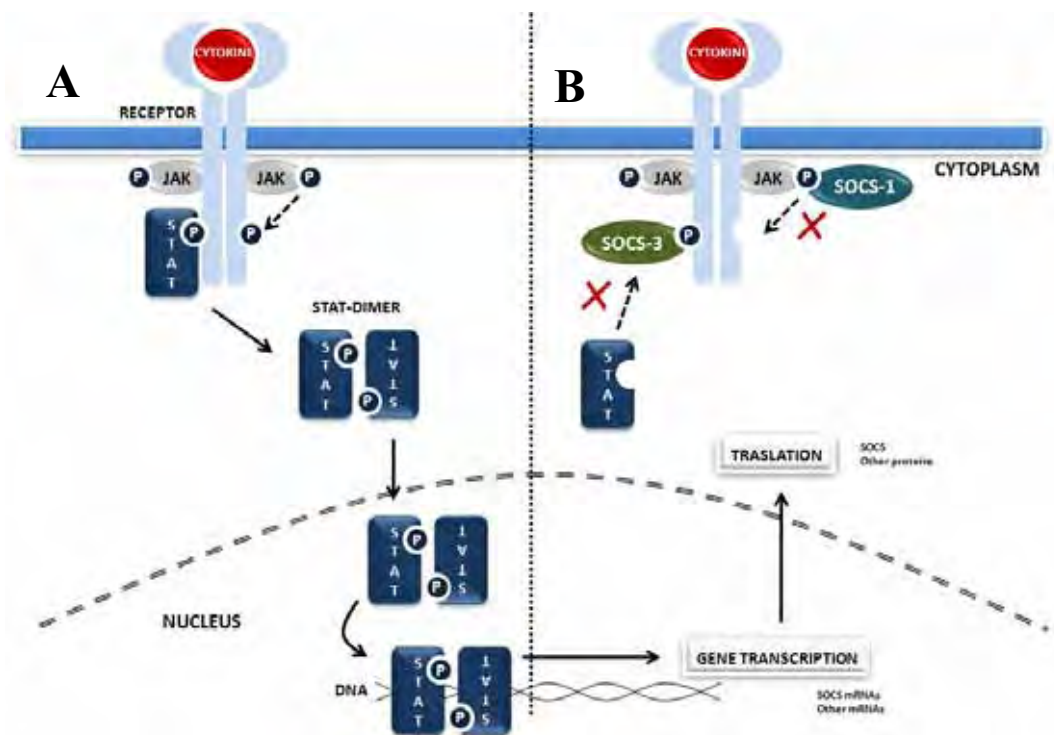


FIGURA 1 - Sinalização intracelular de citocinas e as proteínas SOCS. (A) Esquema ilustrativo da via clássica de transdução de sinais por citocinas inflamatórias. Após a ligação entre a citocina no meio extracelular e seu receptor específico, este dimeriza-se e ativa (por fosforilação, o “p” do esquema) as Janus kinases (JAKs) associadas à porção citoplasmática dos receptores. As JAKs ativadas ativam por fosforilação outros sítios distais na porção citoplasmática dos receptores, aos quais se ligam as proteínas STATs, que também dimerizam-se e após translocação para o núcleo celular atuam como fatores de transcrição iniciando a expressão gênica que vai culminar na resposta biológica associada à citocina que iniciou o sinal. (B) Os possíveis mecanismos pelos quais as proteínas SOCS modulam a sinalização das citocinas inflamatórias. SOCS1 é ilustrado ligando-se à JAK ativada na porção citoplasmática do receptor de citocina, inibindo a ativação de sítios distais na porção citoplasmática dos receptores e, conseqüentemente, o recrutamento e ativação de STATs. SOCS3 é mostrado ligando-se ao sítio de fosforilação na porção citoplasmática do receptor de citocina, impedindo a ativação da JAK. De forma interessante a expressão dos SOCS é induzida transcricionalmente por citocinas inflamatórias.

PROPOSIÇÃO

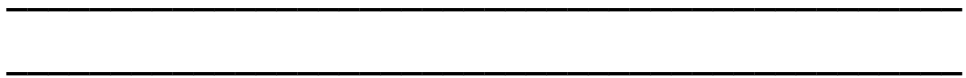
PROPOSIÇÃO

Nossa principal hipótese é de natureza descritiva, e tem o objetivo de responder à seguinte questão: Existem variações importantes na expressão, e/ou atividade dos reguladores negativos de sinalização da via JAK/STAT durante a evolução da doença periodontal? Um melhor entendimento dos mecanismos reguladores negativos da via JAK/STAT durante a resposta inflamatória pode fornecer informações úteis visando à modulação da expressão de genes pró-inflamatórios relevantes para o processo patogênico das doenças periodontais.

Objetivos Específicos:

- 1) Determinar o padrão temporal e os níveis de expressão de SOCS1 e SOCS3, tanto em nível de RNAm quanto protéico durante a evolução da doença periodontal induzida em ratos;
- 2) Neste mesmo modelo avaliar, no nível protéico, a ativação dos fatores de transcrição STAT1 e STAT3.

MATERIAL E MÉTODO



MATERIAL E MÉTODO

Obtenção e manutenção de animais

Foram utilizados 36 ratos Wistar (*Norvegicus albinus*) machos e adultos pesando aproximadamente 250g. Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Farmácia de Araraquara - UNESP, de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP. Os animais foram acomodados em gaiolas de polipropileno e receberam alimentação granulada (Labina/Purina) e água *ad libitum*, sendo pesados semanalmente. O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta faculdade (Anexo 1).

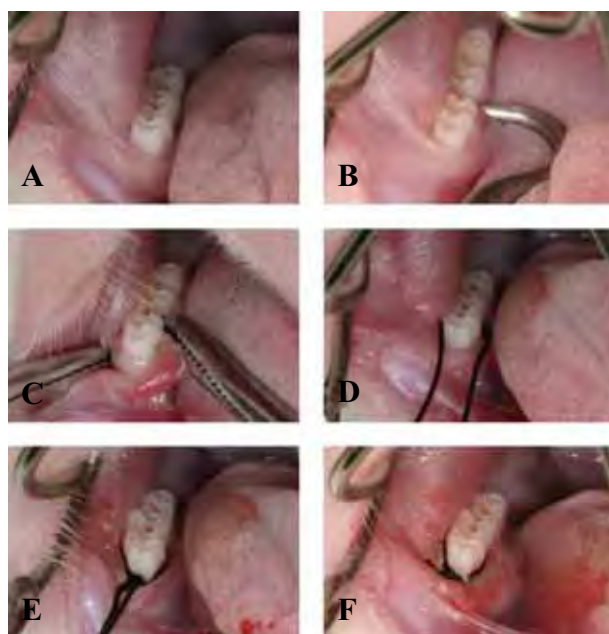
Os 36 animais foram distribuídos em dois grupos experimentais:

- Grupo controle negativo (9 animais): receberam apenas injeção de PBS.
- Grupo experimental (27 animais): submetidos à indução de doença periodontal.

Indução da doença periodontal

Neste estudo, foram utilizados dois modelos de indução da doença periodontal: colocação de ligadura nos primeiros molares inferiores e injeção de LPS na região palatina, entre os primeiros e segundos molares bilateralmente.

Inicialmente os animais foram anestesiados por meio de administração de drogas por via intramuscular na pata posterior (0,08mL de ketamina e 0,04mL de cloridrato de xilasina por 100g de peso corporal) e foram em seguida posicionados em mesa operatória. O modelo de ligadura foi obtido com a colocação de um fio de algodão número 40 ao redor dos primeiros molares inferiores bilateralmente (Figura 2 e 3). Na região palatina entre o 1º e 2º molar, realizou-se com micro seringa *HP Agilent Technologies* (número catálogo - 51823499; volume 10µL; gauge 26; ponta número 2), a injeção de 3µL de LPS (20µg/µL diluído em PBS) de *Eschericia coli* 0127:B8 (número de catálogo - L3129 - purified by phenol extraction - *Sigma Chem Co*) (Figura 4). As injeções de LPS foram repetidas 3 vezes por semana bilateralmente, durante as quatro semanas de duração do experimento, sendo os animais anestesiados previamente à realização das injeções. Os animais do grupo controle negativo não receberam qualquer manipulação, apenas recebendo injeção do veículo (3µL de PBS, pH 7.4) utilizado na diluição do LPS microbiano.



A - Animal antes da colocação da ligadura

B - 1° molar sendo afastado

C - Colocação do fio de algodão

D/E - Fio em posição

F - Ligadura Finalizada

FIGURA 2 - Seqüência de colocação da ligadura no 1° molar inferior.



FIGURA 3 - Ligadura em posição ao redor do primeiro molar inferior após 15 dias de indução da doença evidenciando o acúmulo de biofilme dental ao redor da ligadura bem como a inflamação gengival ao redor do primeiro molar.

INJEÇÃO DE LPS



FIGURA 4 - Injeção de LPS entre o 1° e 2° molares superiores.

Sacrifício dos animais, obtenção de amostras e delineamento experimental

Após 7, 15 e 30 dias do início do experimento, 9 animais do grupo experimental, bem como 3 animais do grupo controle negativo foram sacrificados. A seleção destes períodos considerou a representação do início da agressão ou períodos precoces do desenvolvimento da resposta imune-inflamatória nos tecidos periodontais (7 dias), uma vez que a ativação das vias de sinalização e expressão de citocinas é usualmente bastante rápida e transitória, com alterações no perfil de citocinas expressas segundo a fase de desenvolvimento da resposta inflamatória e doença periodontal. Os períodos de 15 e 30 dias seriam representativos da doença instalada em nível moderado/avançado de severidade. A cronologia do experimento está representada na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 - Cronologia do Experimento

<i>Tempo (dias)</i>	<i>0</i>	<i>7</i>	<i>15</i>	<i>30</i>
Colocação da ligadura	+			
Sacrifício		+	+	+

+ Significa que o procedimento foi realizado no período indicado.

* Injeções de LPS serão realizadas 3 vezes/semana, durante as 4 semanas.

Imediatamente após o sacrifício, a mandíbula de cada animal foi removida e separada em duas hemimandíbulas, assim como os blocos envolvendo 1º e 2º molares superiores. Estas peças provenientes da mandíbula e da maxila foram então reduzidas e destinadas a processamento histológico ou a análise

macroscópica óssea e extração de RNA total ou proteínas do tecido gengival, conforme apresentado na tabela abaixo (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de hemimaxilas e hemimandíbulas destinadas a cada experimento

<i>Experimento</i>	<i>Controle (n por período)</i>	<i>Grupos Experimentais (n por período)</i>
Análise Histológica	2	4
Extração de RNA (RealTime PCR)	2	6
Extração de Proteínas (Western Blot)	1	3
Análise Macroscópica da Área de Reabsorção Óssea	2	5

As peças destinadas à análise histológica foram fixadas por 48h em formol tamponado 4%, descalcificadas em EDTA (0.5M, pH 8.0) durante 3 meses (com troca de solução 3X por semana) e posteriormente incluídas em parafina. Cortes seriados de 4 μ m de espessura foram obtidos no plano frontal, montados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina (H/E). Os cortes histológicos foram submetidos à análise quantitativa e qualitativa do processo inflamatório.

As peças destinadas à extração de RNA ou proteínas totais tiveram os tecidos gengivais ao redor dos dentes envolvidos coletados e congelados em nitrogênio líquido imediatamente após o sacrifício e posteriormente transferidos para freezer -80°C (Figura 5). Em seguida, as mesmas peças foram utilizadas para análise macroscópica da perda óssea alveolar.

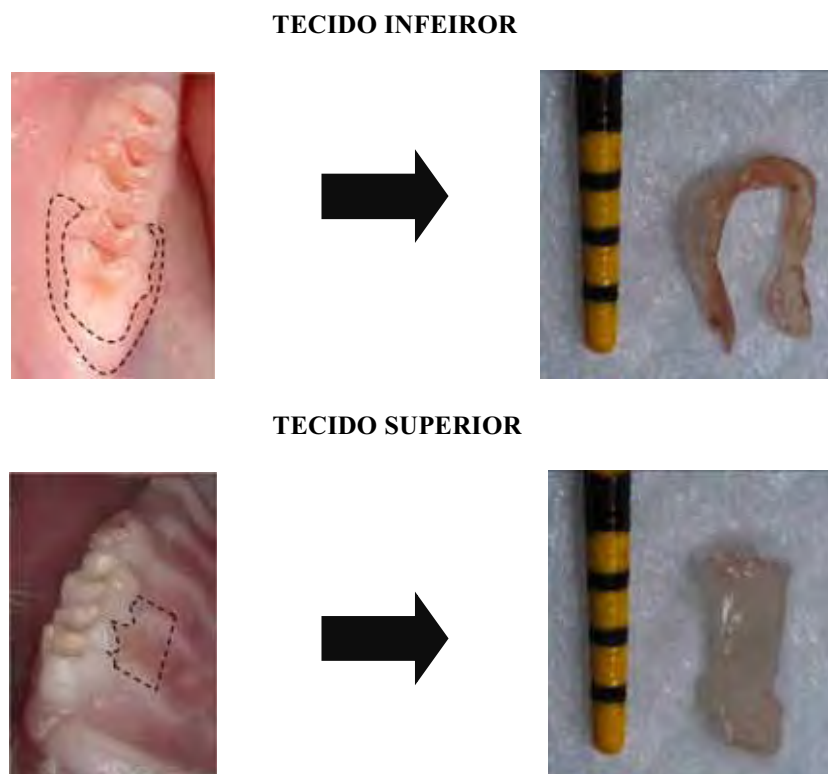


FIGURA 5 - Tecidos coletados para extração de RNA total e proteínas pesando aproximadamente 4mg. Os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C.

Análise macroscópica da área de reabsorção óssea

Com o objetivo de confirmar a destruição periodontal, induzida pela doença experimental, a área de reabsorção óssea nas faces linguais/palatinas dos molares envolvidos foram medidas macroscopicamente. Sete peças de cada um dos períodos experimentais (7, 15 e 30 dias) sendo 5 do grupo experimental e 2 do grupo controle, cujos tecidos moles foram retirados para extração de RNA/proteínas, foram imersas em peróxido de hidrogênio por 24 horas com o objetivo de remover os tecidos moles remanescentes e posteriormente limpas com

auxílio de uma sonda exploratória e escovadas. Posteriormente as peças foram armazenadas em álcool 70% e coradas com azul de metileno (1,4g de azul de metileno foram dissolvidos em 100ml de etanol 95%. 5ml dessa solução foram diluídos em 95ml de água): as peças foram retiradas do álcool 70%, secas, imersas por 5 minutos no corante previamente preparado e posteriormente lavadas rapidamente com água para retirar o excesso de corante.

A face lingual das peças inferiores coradas foi fotografada em microscópio (*Leica MZ6* - magnificação de 20X) juntamente com papel milimetrado (utilizado para calibrar o software de medição *UTHSCSA ImageTool 3.0*) e medidas por examinador cego para os grupos experimentais. A face lingual foi escolhida pelo fato de que a face vestibular apresenta tábua óssea que sobrepõe à crista óssea alveolar, impedindo a medição correta da reabsorção alveolar. Foi medida a área compreendida pela perda óssea do 1º molar inferior (dente que recebeu a ligadura) (Figura 6A).

Nas peças superiores (indução da doença por LPS) foi medida a área de perda óssea compreendida pela raiz distal do primeiro molar e pela raiz mesial do segundo molar (Figura 6B). Esta área medida corresponde ao local de aplicação do LPS.

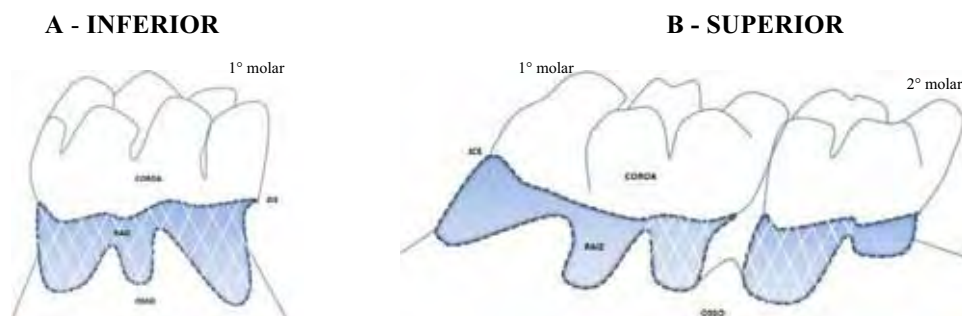


FIGURA 6 - Desenho representativo. A área hachurada corresponde à área de perda óssea alveolar calculada.

Estereometria

A análise estereométrica foi realizada de forma similar à descrita anteriormente por nosso grupo de pesquisa^{15,20}.

A análise estereométrica do processo inflamatório foi realizada com o auxílio de um microscópio de luz *Leica DMLS* (na magnificação de 200X). Um total de 3 cortes foi avaliado por dente. Um intervalo 100 μ m foi dado entre esses cortes com o objetivo de se obter em 300 μ m de extensão, áreas representativas das porções mesial, média e distal do dente. As áreas de interesse dos cortes pré-selecionados foram fotografadas com uma câmera digital *Leica DFC 300 FX* e as imagens capturadas foram arquivadas.

A técnica estereométrica de contagem de pontos foi empregada nos cortes corados com H/E para avaliação da proporção de componentes teciduais coincidentes com os pontos de intersecção, em um plano bidimensional. Este procedimento permite a avaliação quantitativa do quadro inflamatório nas proximidades da agressão.

Com esta finalidade, foi determinada a densidade volumétrica relativa (ou proporção) dos seguintes componentes teciduais: fibras colágenas, fibroblastos, células inflamatórias e vasos sanguíneos. Nos cortes inferiores, duas diferentes localizações anatômicas da porção vestibular e lingual dos cortes foram quantificadas: A- Submarginal - o tecido conjuntivo subjacente ao sulco gengival, junto à base do epitélio juncional (EJ) – O limite coronal foi representado pela borda apical do epitélio juncional e a estrutura dental correspondeu ao limite medial (Figura 7A). B- Supracristal - o tecido conjuntivo próximo ao topo da crista óssea (CO) – O limite apical foi delimitado adjacente a porção mais coronal da crista óssea e a estrutura dental correspondeu ao limite medial (Figura 7B).

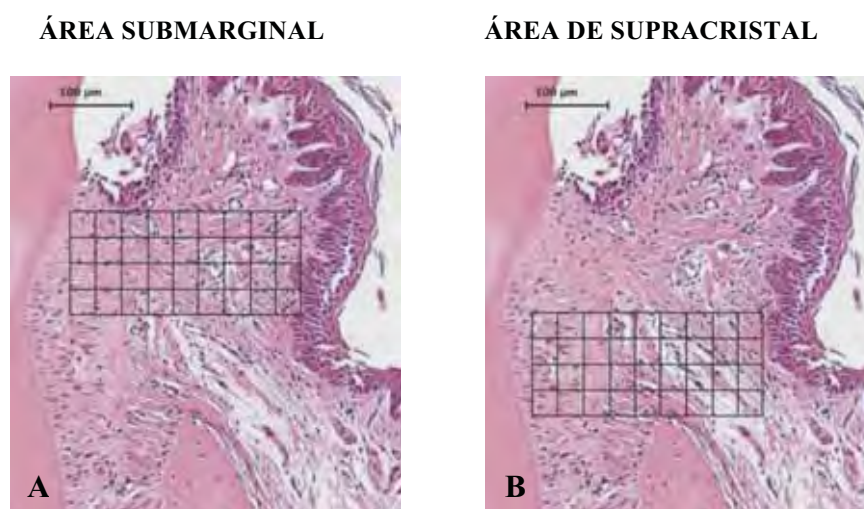


FIGURA 7 - Posição das grades sobrepostas às imagens.

Nos cortes que receberam a injeção de LPS, foi realizada apenas a análise da região palatina.

Após a captura de imagens, a quantificação foi feita com o auxílio de grade confeccionada com $32400\mu\text{m}^2$ de área. Esta grade foi posicionada

(sobreposta) preenchendo as duas regiões de interesse da imagem (EJ e CO) utilizando o software *Adobe Photoshop CS4*. Para cada grade, foram contados 50 pontos coincidentes sobre as estruturas histológicas. Em seguida, foi feita uma análise percentual de cada componente tecidual em relação ao número total de pontos contados por período experimental baseado nos trabalhos de Liu et al.⁴⁰ e de Odze et al.⁵² para a representação gráfica da estereometria. Todas as análises foram realizadas três vezes por um examinador cego para os grupos experimentais.

Estes mesmos cortes foram submetidos a uma segunda forma de análise estereométrica. O processo inflamatório foi determinado através de um escore de células inflamatórias (PMN/mononucleares) de acordo com Liu et al.⁴⁰: 0, ausência de células inflamatórias; 1, inflamação leve, com uma pequena quantidade de células inflamatórias; 2, inflamação moderada (número significativo de células inflamatórias difusas pelo tecido conjuntivo acima da crista óssea); 3, inflamação severa, com predominância de células inflamatórias. Para a aplicação deste sistema de escores, os cortes histológicos mandibulares foram divididos em 3 áreas de forma fictícia, tendo como base o topo da crista óssea, em direção ao tecido conjuntivo gengival. As regiões pré-determinadas e avaliadas foram: A, próxima ao dente; B, o centro da crista óssea, C, lateralmente à crista óssea (Figura 8). O modelo de ligadura foi avaliado para essas 3 regiões pelo lado vestibular e lingual. Já os cortes maxilares, tratados com LPS, sofreram análise da porção palatina. O valor médio para cada animal foi determinado e

usado para avaliar a extensão do quadro inflamatório durante os diferentes períodos experimentais dos modelos de ligadura e LPS.

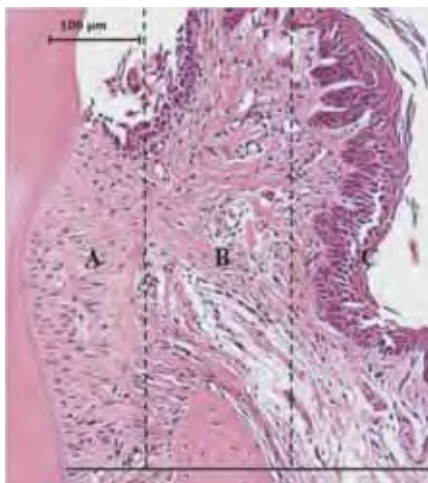


FIGURA 8 - Divisão do corte em 3 seções: (A) próximo ao dente (B) centro da crista óssea (C) lateralmente à crista óssea.

Extracção de RNA total, transcrição reversa e PCR em tempo real

O RNA total dos tecidos coletados foi extraído com o kit *RNAqueous-4PCR*, segundo o protocolo do fabricante (*Ambion, Inc*).

O tecido coletado foi macerado em 100µL de tampão de lise em tubo de 1,5mL com o auxílio de pilão plástico fornecido com o kit. O mesmo volume (100µL) de etanol 64% foi adicionado ao tecido lisado e misturado cuidadosamente. Essa mistura foi transferida para um filtro e centrifugada a 15000g por 1min. O filtrado foi descartado e o “cartucho” do filtro utilizado nos passos seguintes. 700µL da solução de lavagem número 1 foram passados pelo filtro, utilizando à centrífuga, como no passo anterior. Do mesmo modo, o filtrado

foi descartado e o filtro preservado. O mesmo procedimento foi repetido por 2 vezes com 500 μ L de solução de lavagem número 2/3.

O filtro foi transferido para um novo tubo coletor e a solução de eluição (previamente aquecida a 70°C) pipetada no centro do filtro. Essa primeira alíquota foi de 40 μ L. Em seguida, o filtro foi fechado. A solução obtida foi centrifugada por 30s, a 15000g, em temperatura ambiente. Uma segunda alíquota de 10 μ L foi pipetada no centro do filtro e a solução novamente centrifugada por 30s. (Essa segunda alíquota foi coletada no mesmo tubo da primeira.)

A solução obtida foi misturada cuidadosamente e tratada com 5 μ L de tampão de DNase 1 (volume igual a 10% do volume total da solução) e 1 μ L de DNase, para cada amostra. Em seguida, incubada por 30 min a 37°C.

Os passos seguintes removeram a DNase da preparação. Foram adicionados 5,6 μ L do reagente de inativação da DNase (quantidade igual a 10% do volume total da solução). O tubo foi agitado com cuidado (para dispersar o reagente) e incubado por 2min em temperatura ambiente, sendo que, durante esse tempo, foi agitado mais uma vez. Cada amostra foi centrifugada a 10000g por 1min para formar um pellet do reagente de inativação da DNase.

A quantidade e pureza do RNA foram determinadas em espectrofotômetro de luz UV (*Biomate 3 - Thermo Electron Corporation*) por meio da avaliação das absorvâncias a 260nm e da relação entre as absorvâncias a 260/280nm, respectivamente. A integridade do RNA total foi avaliada por meio de resolução de 0,5 μ g do RNA purificado em eletroforese em gel de agarose 1%.

A integridade foi determinada pela observação de bandas bem definidas correspondentes aos fragmentos 18S e 28S do RNA ribossômico (Figura 9).

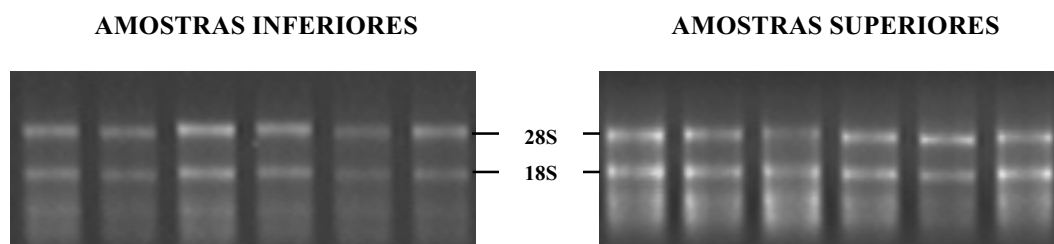


FIGURA 9 - Eletroforese em gel de agarose 1% para avaliar a integridade do RNA total extraído pela observação de bandas bem definidas correspondentes aos fragmentos 18S e 28S do RNA ribossômico de 6 das amostras extraídas por modelo de indução.

A síntese de cDNA foi realizada subsequente em termociclador (*MyCycler - Bio-Rad*), utilizando o kit TaqMan Reverse Transcription Reagents. Foram utilizados 400ng de RNA total por amostra na presença de água livre de nucleases, Oligo-dT, dNTPs, MgCl₂, inibidor de RNase e enzima de transcriptase reversa, de acordo com o protocolo do fabricante (*Applied Biosystems*) nas seguintes condições de ciclagem: 25^oC por 10 minutos, 48^oC por 30 minutos e 95^oC por 5 minuto.

1μL do produto da reação de transcrição reversa foi utilizado num volume total de reação de PCR de 20μL. Este volume incluiu, além do produto da reação de RT, 8μL água livre de nucleases, 10μL *TaqMan gene expression master mix* e 1μL *TaqMan gene expression assays* (*Applied Biosystems*) para os genes alvo de rato (Tabela 3).

Tabela 3 - Informações sobre os conjuntos de primers e sondas TaqMan pré-otimizados para PCR em tempo Real (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems)

<i>Gene Alvo</i>	<i>Assay ID</i>	<i>Acession #</i>	<i>Amplicon (bp)</i>
GAPDH	<u>Rn99999916_s1</u>	<u>NM_017008.3</u>	87
SOCS1	<u>Rn00595838_s1</u>	<u>NM_145879.1</u>	76
SOCS3	<u>Rn00585674_s1</u>	<u>NM_053565.1</u>	73
RANKL	<u>Rn00589289_m1</u>	<u>NM_057149.1</u>	69
OPG	<u>Rn00563499_m1</u>	<u>NM_012870.2</u>	75
TNF-α	<u>Rn01525859_g1</u>	<u>NM_012675.2</u>	92
IL-6	<u>Rn99999011_m1</u>	<u>NM_012589.1</u>	90
IL-10	<u>Rn00563409_m1</u>	<u>NM_012854.2</u>	70

As condições pré-otimizadas de ciclagem utilizadas foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O PCR em tempo real foi realizado em um equipamento Step One Real Time PCR System (*Applied Biosystems*). Os níveis relativos da expressão dos genes foram calculados de acordo com as instruções da *Applied Biosystems*, utilizando a GAPDH como gene normalizador.

Os dados foram expressos usando o método de Ciclo limite (Ct ou *Cycle threshold*), ou seja, o número de ciclos no qual a curva logarítmica de PCR cruza uma linha de corte arbitrariamente calculada. Os valores foram normalizados subtraindo-se o Ct obtido da amplificação específica do gene alvo

pelo Ct do gene normalizador (ΔCt). Devido à característica logarítmica desse valor, houve a utilização do parâmetro $2^{-\Delta Ct}$, para a expressão dos dados.

Western blot

A ativação de STAT1 e STAT3 bem como a expressão global de SOCS1 e SOCS3 foram avaliadas utilizando amostras de proteína total extraídas dos tecidos gengivais coletados dos ratos representativas dos diferentes períodos experimentais.

Para isto, foi preparado o tampão de extração contendo T-PER (Tissue Protein Extraction Reagent - Pierce) e o coquetel inibidor de protease (Protein Stabilizing Cocktail - Pierce). 30 μ L deste tampão foi adicionado a cada um dos tecidos, os quais foram macerados, centrifugados por 5 minutos a 13.000 RPM a 4°C (Sorvall fresco), com posterior remoção do sobrenadante. Os extratos de proteína foram então quantificados pelo método de Bradford (Bio-Rad) a 595nm em leitor de ELISA ELx 800 (Bio-Tek).

Em seguida, as amostras de proteína foram homogeneizadas a um tampão de amostra contendo SDS 2% (3x SDS Sample Buffer Blue - Cell Signaling) e 41.7mM de DTT (30x DTT - Cell Signaling). Esta homogenização foi feita em gelo, seguida de fervura para desnaturação protéica a 97°C por 5 minutos, posterior centrifugação de 30 segundos a 13000 RPM (centrífuga 5415D - Eppendorf) e manutenção em gelo por 5 minutos, procedimentos também realizados para o padrão de peso molecular biotínido (Cell Signaling).

Para o Western blot, 30 μg de cada uma das amostras foram carregadas nos poços de géis de poliacrilamida Tris-Cl a 10% (Mini-Protean 3 cell - Bio-Rad) para resolução por eletroforese descontínua (SDS-PAGE), utilizando voltagem constante de 100V por 90 minutos, seguidos de eletro-transferência (Mini Trans-blot Electrophoretic Transfer Cell - Bio Rad) para membranas de nitrocelulose com poros de 0,45 μm (Bio-Rad) em tampão contendo 20% de metanol utilizando corrente constante de 300mA por 60 minutos. Após o bloqueio em tampão Tris-NaCl (TBS) contendo 5% de leite desnatado liofilizado (tampão de bloqueio) por 1 hora sob agitação (TS-2000 VDRL shaker - Biomixer) à temperatura ambiente, as membranas receberam 3 lavagens de 10 minutos com tampão TBS-Tween (TBS-T) a 0,1% e foram incubadas sob agitação (Mini Rocker MR-1 - Biosan) overnight a 4°C com os anticorpos primários para as proteínas de interesse: SOCS1, -3 (1:200 - Santa Cruz Biotechnology), phospho-STAT1, -3 (1:100 - Santa Cruz Biotechnology), STAT1, -3 (1:200 - Santa Cruz Biotechnology), além de GAPDH (1:500 - Santa Cruz Biotechnology) para confirmar que quantidades iguais de proteínas totais foram utilizadas. Os anticorpos secundários utilizados (conjugados à horseradish peroxidase) foram diluídos de acordo com as instruções do fabricante (Santa Cruz Biotechnology). Para p-STATs, utilizou-se o anticorpo secundário anti-cabra (1:5000 - Santa Cruz Biotechnology) diluído em blocking buffer e para as demais proteínas, um anticorpo secundário anti-coelho (Santa Cruz Biotechnology) nas mesmas condições. Após remoção do anticorpo primário e 3 lavagens de 10 minutos com TBS-T, a incubação com o secundário foi realizada por 1 hora à temperatura

ambiente sob agitação (TS-2000 VDRL shaker - Biomixer). Em seguida, as membranas foram novamente lavadas e a detecção da presença das proteínas realizada por um sistema de quimioluminescência (ELC, Pierce).

Imagens digitalizadas dos filmes radiográficos para Western blot foram obtidas em um sistema de digital de fotodocumentação (ImageQuant 100 - GE Healthcare).

Análise Estatística

Os dados obtidos em nosso estudo foram divididos em 2 grupos de acordo com os modelos experimentais de indução da doença periodontal utilizados sendo que a análise estatística foi realizada separadamente em cada um destes modelos (ligadura e LPS) utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Para análise da área de reabsorção óssea, análise quantitativa dos componentes teciduais por estereometria e PCR em tempo real a análise estatística foi feita através de análise de variância one-way Anova seguido de comparação entre os grupos com o teste de Tukey. Para análise qualitativa (escores) do processo inflamatório por estereometria foi utilizado teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* complementado pelo teste de comparação múltipla de Dunn para avaliar a diferença entre os períodos de indução da doença. Foi considerado nível de 5% de significância como regra de decisão por uma diferença significativa.

RESULTADO

RESULTADO

Análise macroscópica da área de reabsorção óssea

A área de perda óssea dos animais experimentais e controles foi medida macroscopicamente. Os valores obtidos da média de perda óssea dos animais experimentais foram subtraídos das médias de perda dos grupos controle divididos por período. Os resultados foram submetidos ao teste paramétrico *One-way ANOVA* complementado pelo teste de Tukey para avaliar a diferença entre os períodos de indução da doença e estão apresentados nas figuras abaixo (Figuras 10 e 11).

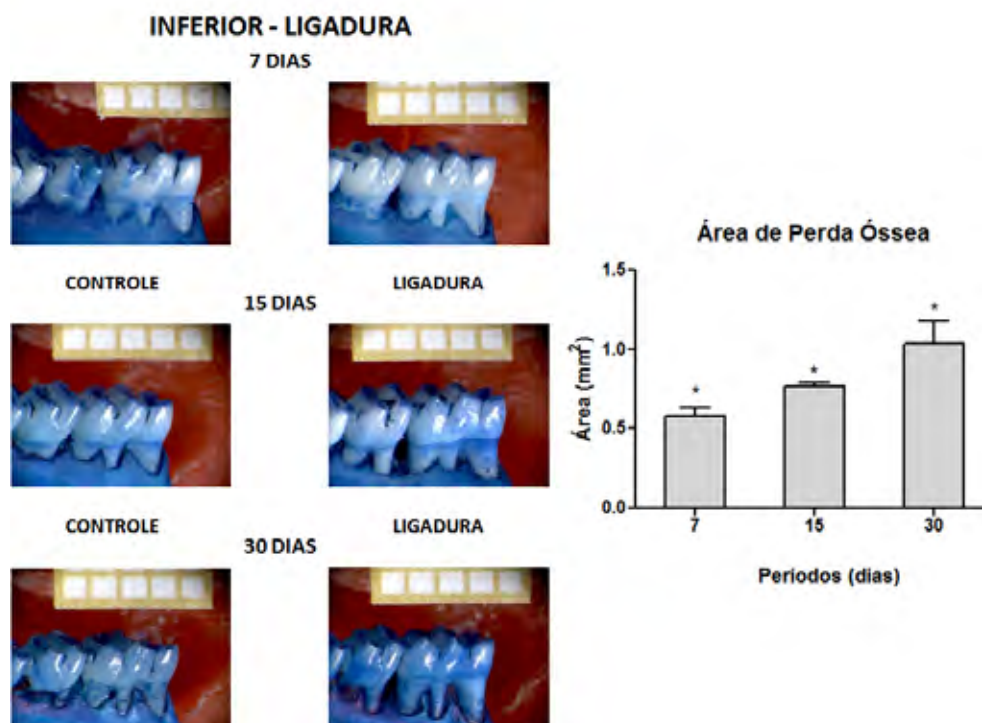


FIGURA 10 - Média e desvio padrão da área da perda óssea (mm²), na face lingual dos molares inferiores, de acordo com os períodos experimentais (7, 15 e 30 dias). (* p < 0,05 em relação aos outros períodos).

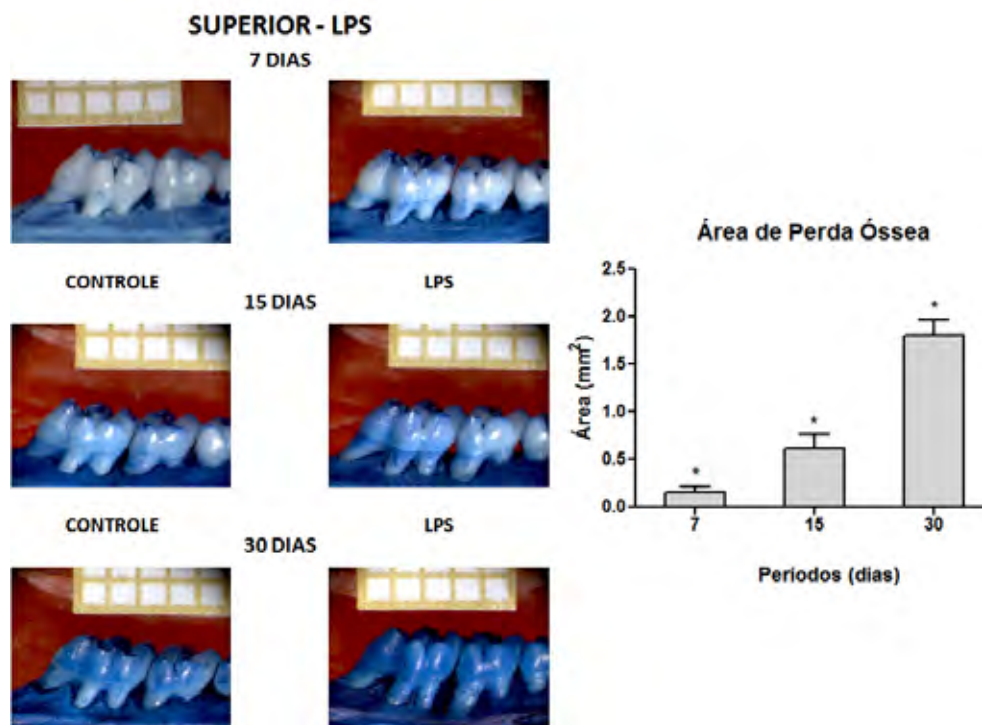


FIGURA 11 - Média e desvio padrão da área da perda óssea (mm^2), na face palatina dos molares superiores, de acordo com os períodos experimentais (7, 15 e 30 dias). (* $p < 0,05$ em relação aos outros períodos).

Apesar dos modelos de indução de doença periodontal tanto por ligadura quanto por LPS já estarem estabelecidos na literatura ^{15, 28, 56}, estes resultados comprovam que a indução da doença periodontal experimental em nosso estudo foi efetivamente realizada, por ambos os métodos. É interessante notar que no método de ligadura a perda óssea já é expressiva no período de 7 dias, sugerindo um processo agudo de perda tecidual que pode ter sido gerado pelo trauma mecânico associado à colocação da ligadura, seguido de uma progressão significativa, porém mais lenta nos demais períodos, sugerindo um processo crônico. Já no método do LPS, a destruição inicia-se mais lentamente, porém mantém um ritmo de perda óssea acelerado mesmo nos períodos

posteriores, provavelmente, como resposta às aplicações repetidas de LPS até o final do experimento.

Esteriométrica

Com as amostras obtidos dos cortes histológicos (Figuras 12 e 13) de 6 animais por período (2 do grupo controle negativo e 4 do grupo experimental), foram feitas as análises estereométricas:

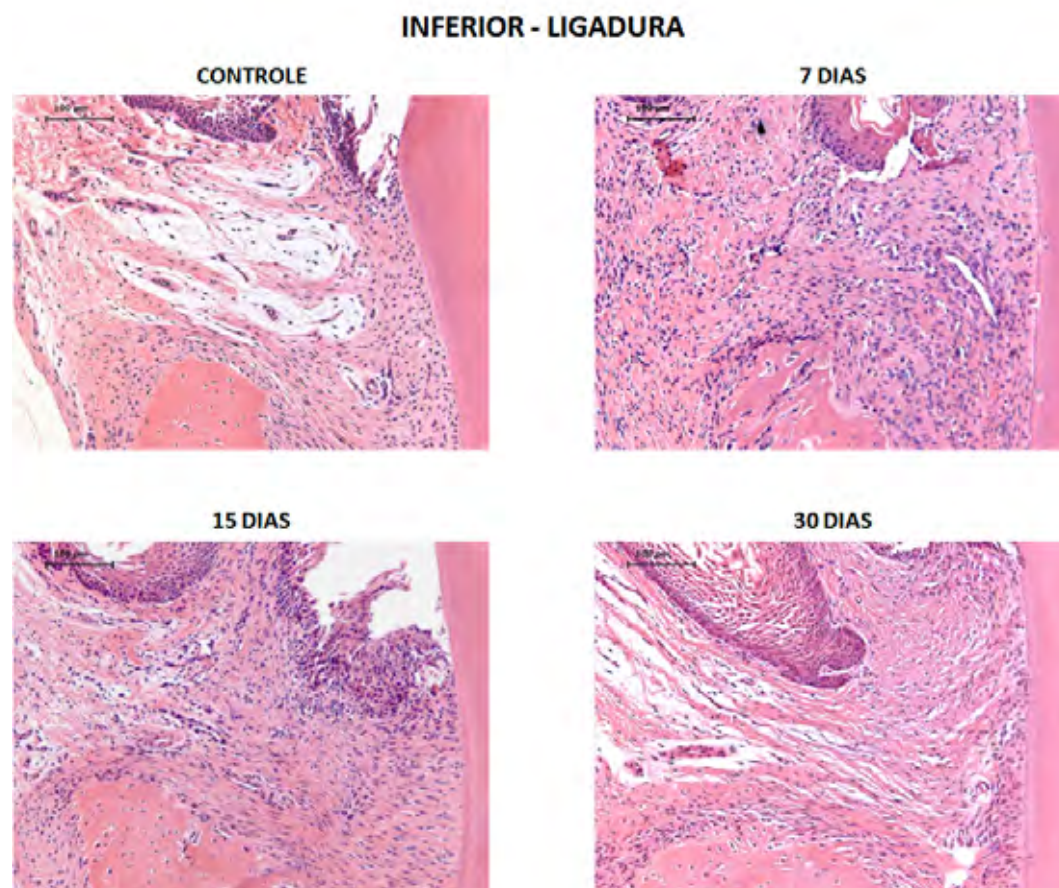


FIGURA 12 - Imagens obtidas (200X) dos cortes histológicos inferiores corados com H/E de acordo com os períodos experimentais (7, 15 e 30 dias).

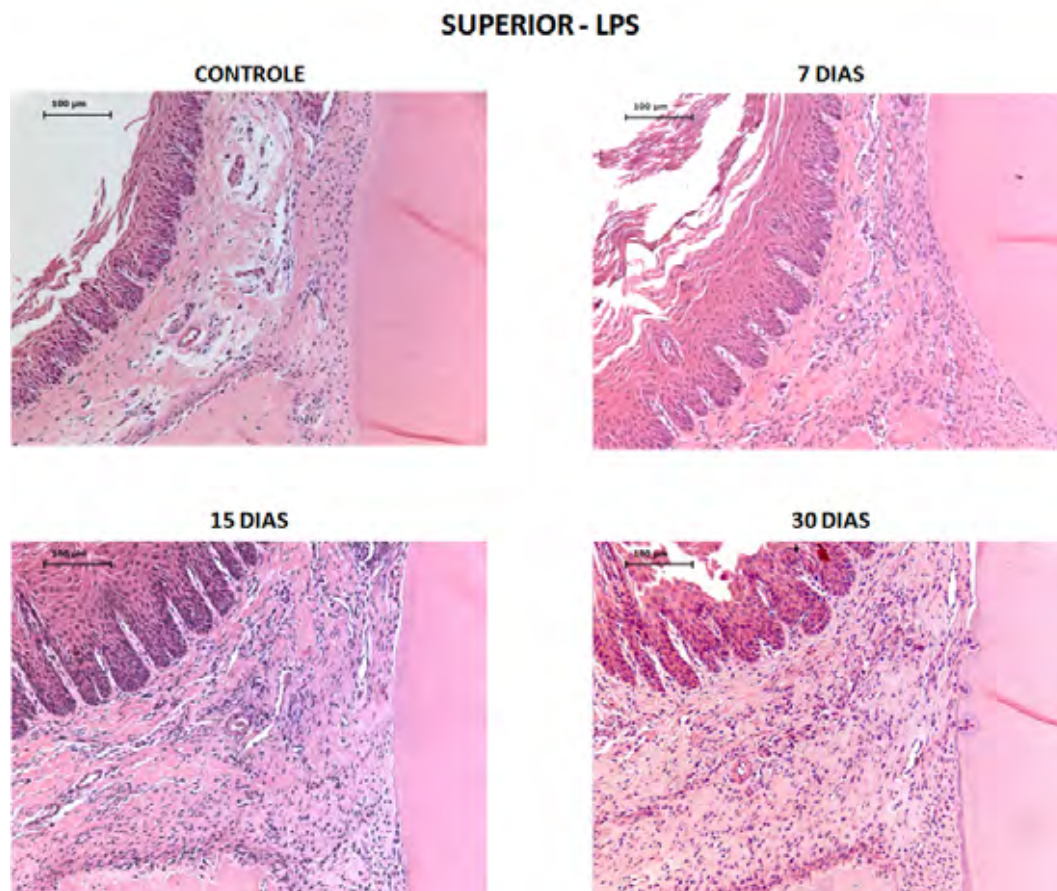
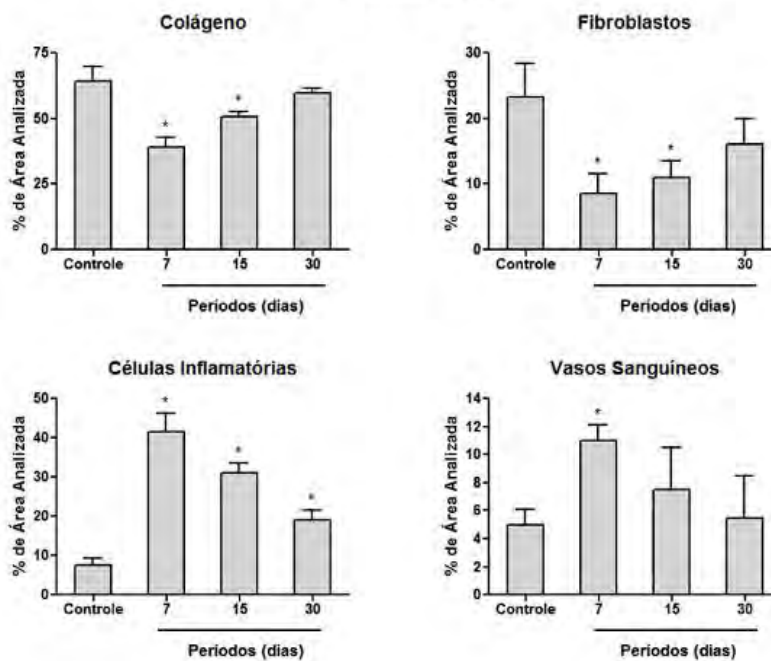


FIGURA 13 - Imagens obtidas (200X) dos cortes histológicos superiores corados com H/E de acordo com os períodos experimentais (7, 15 e 30 dias).

A - Contagem de Pontos - Análise Quantitativa dos Componentes Teciduais

Os resultados foram submetidos ao teste paramétrico *One-way ANOVA* complementado pelo teste de Tukey para avaliar a diferença entre os períodos de indução da doença e estão apresentados nos gráficos abaixo:

**INFERIOR - LIGADURA
SUBMARGINAL**



CRISTA ÓSSEA

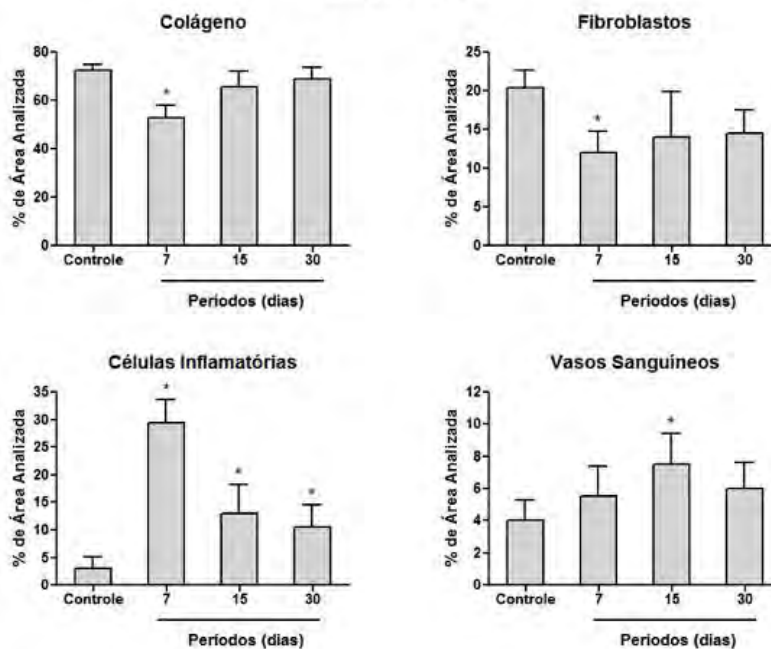


FIGURA 14 - Resultados da análise estereométrica dos componentes teciduais dos cortes histológicos inferiores através da técnica de contagem de pontos. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle).

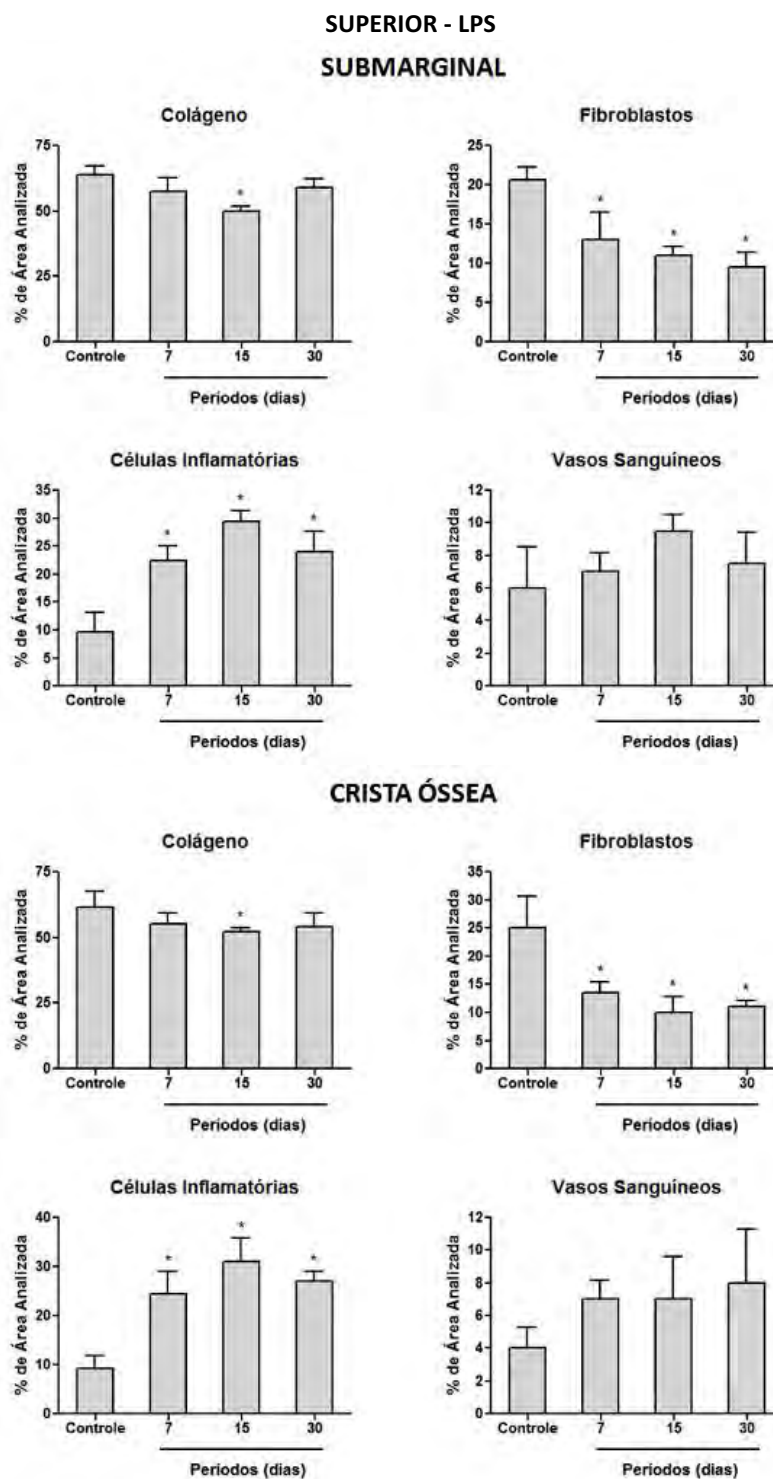


FIGURA 15 - Resultados da análise estereométrica dos componentes teciduais dos cortes histológicos superiores através da técnica de contagem de pontos. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle).

A análise estereométrica (Figuras 14 e 15) e as imagens ilustrativas (Figuras 12 e 13) demonstram que em ambos os modelos de indução de doença periodontal (ligadura e LPS) ocorreu evidente reação inflamatória. Esta reação é representada por um aumento significativo no número de células inflamatórias e estruturas vasculares. A mudança na composição do tecido conjuntivo, incluindo uma diminuição sobre o número de fibroblastos e na densidade de colágeno é um achado comum na doença periodontal. As características histológicas gerais associadas aos modelos de LPS e ligadura são semelhantes; porém, a severidade da inflamação é reduzida progressivamente no modelo de indução por ligadura quando comparados os 3 períodos experimentais, bem como há uma tendência de aumento no número de fibroblastos e colágeno, nos períodos de 15 e 30 dias.

No modelo de doença periodontal induzida por LPS a inflamação é sustentada, tanto na área submarginal como na área de crista óssea ao longo do período experimental de 30 dias, o que é coerente com o desafio do sistema imune do hospedeiro ao estímulo agressivo persistente (LPS), já que as injeções foram realizadas 3 vezes por semana durante todo o período experimental.

B - Escores - Análise Qualitativa do Processo Inflamatório

Os resultados foram submetidos ao teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* complementado pelo teste de comparação múltipla de Dunn para avaliar a diferença entre os períodos de indução da doença. Como não foram encontradas

diferenças entre as densidades celulares nas 3 áreas analisadas, os escores foram combinados e os resultados obtidos estão apresentados nas figuras abaixo:

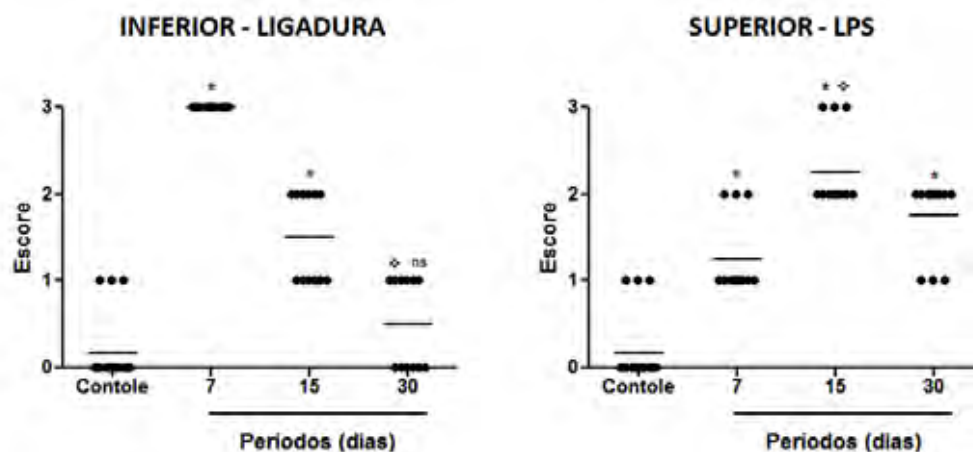


FIGURA 16 - Resultados da análise qualitativa do processo inflamatório. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle).

É interessante notar que no modelo de indução de doença periodontal por ligadura (Figura 16), atingiu-se o escore máximo já no período de 7 dias de indução da doença. A severidade da inflamação foi reduzida progressivamente quando comparados os 3 períodos experimentais, sendo que no período de 30 dias ocorreu uma significativa diminuição do infiltrado celular.

Já no modelo de indução por LPS (Figura 16), é interessante observar a significativa manutenção do infiltrado celular em todos os períodos experimentais. Este fato se deve ao estímulo agressivo persistente, representado pelas injeções de LPS 3 vezes por semana, durante todo período experimental.

PCR em tempo real

Com amostras obtidas de 8 animais por período (2 do grupo controle negativo e 6 do grupo experimental), foi feita a quantificação da expressão de RNAm de SOCS1 e SOCS3, dos mediadores envolvidos na osteoclastogênese RANKL e OPG, das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6 e da citocina anti-inflamatória IL-10 durante a evolução da doença periodontal induzida experimentalmente por ligadura e LPS utilizando PCR em tempo real. Os dados obtidos das médias das duplicatas de cada amostra foram normalizados para níveis de expressão de GAPDH e expressos como “*fold-change*” em relação aos níveis nos animais sem indução de doença. Os resultados foram submetidos ao teste paramétrico *One-way ANOVA* complementado pelo teste de Tukey e estão apresentados na figura abaixo (Figuras 17 e 18).

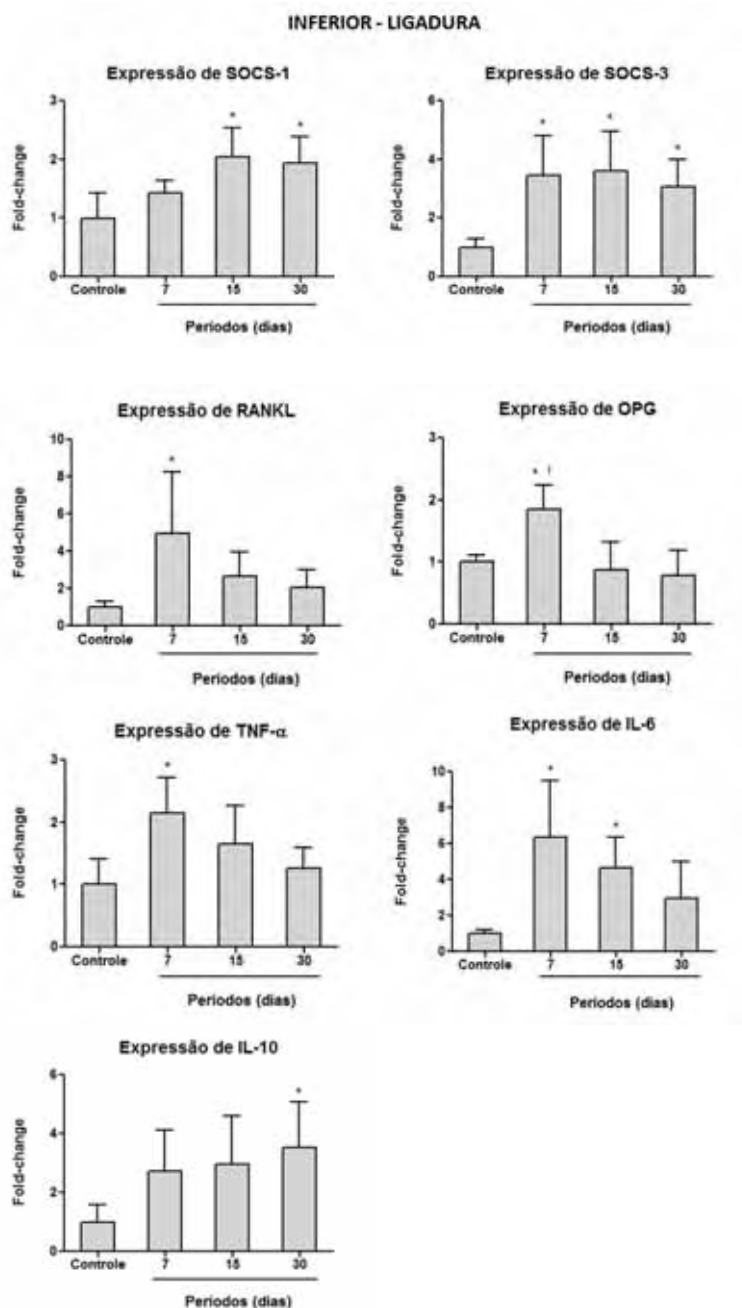


FIGURA 17 - As barras nos gráficos indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão de 6 amostras inferiores (ligadura) por período de acordo com os períodos experimentais (7, 15 e 30 dias). (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; ! $p < 0,05$ em relação aos grupos dos outros períodos).

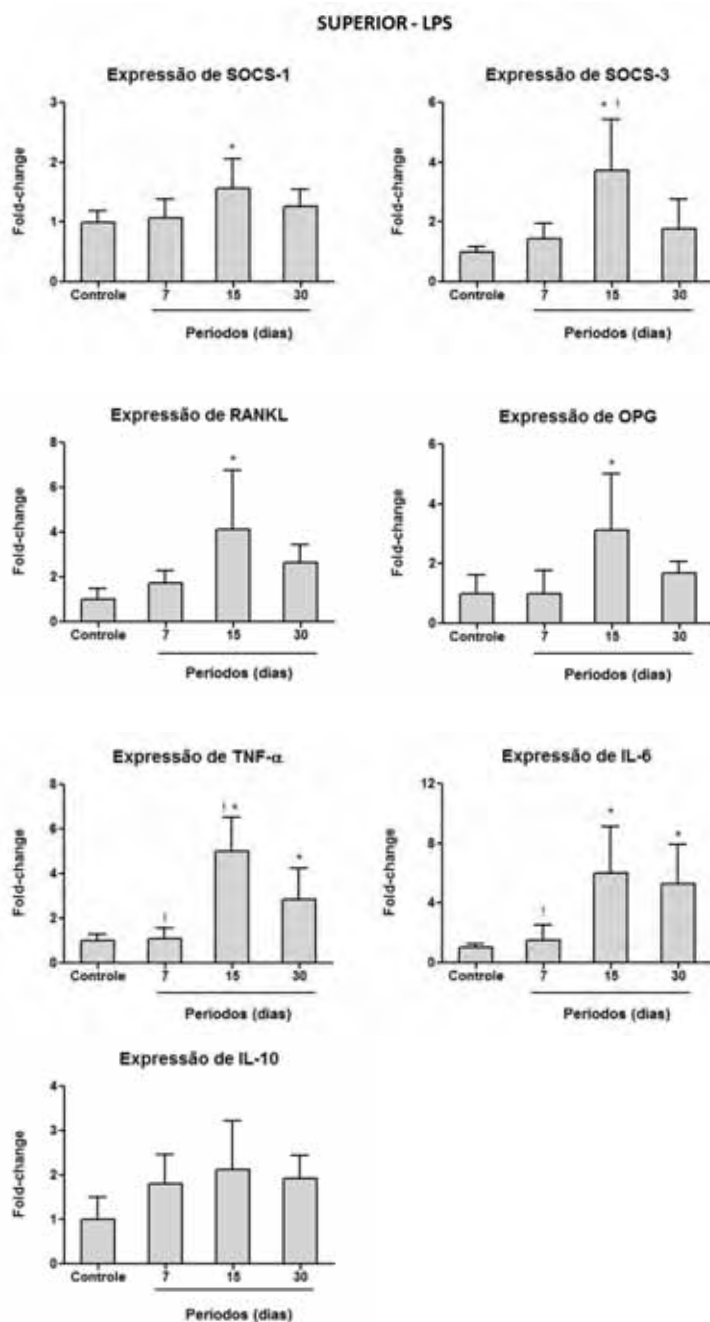


FIGURA 18 - As barras nos gráficos indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão de 6 amostras superiores (LPS) por período de acordo com os períodos experimentais (7, 15 e 30 dias). (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; † $p < 0,05$ em relação aos grupos dos outros períodos).

Os resultados apresentados demonstram que houve regulação evidente da expressão de SOCS1 e SOCS3, que apresentaram os níveis aumentados já a partir dos 7 dias em relação aos animais do grupo controle, com pico de expressão aos 15 dias por ambos os modelos (ligadura e LPS).

A expressão de RNAm de mediadores proinflamatórios e anti-inflamatórios também foram avaliadas com o objetivo de caracterizar o perfil inflamatório nos diferentes períodos e modelos de indução. É interessante observar que tanto os mediadores ligados a osteoclastogênese quanto os mediadores proinflamatórios obedecem a mesma cinética de expressão. No modelo de ligadura, apresentam pico de expressão aos 7 dias, sendo que nos períodos seguintes a expressão diminui significativamente de forma progressiva. Já no modelo de LPS, o pico de expressão destes mediadores ocorre aos 15 dias, sendo que aos 30 a expressão é diminuída, porém ainda é maior que no grupo controle e 7 dias. Em relação à citocina antiinflamatória IL-10, observamos nos 2 modelos uma tendência a aumento ao longo dos 30 dias, sendo que esta tendência foi atenuada no modelo de LPS.

Western blot

Com amostras obtidas de 12 animais por modelo (3 do grupo controle negativo e 9 do grupo experimental sendo 3 amostras por período), foram feitos três experimentos independentes para avaliar a presença e o padrão temporal dos níveis de expressão protéica de SOCS1 e -3. A ativação dos fatores de transcrição

STAT1 e -3 também foi avaliada por meio de suas formas totais e fosforiladas. Para demonstrar que a mesma quantidade de proteínas foi carregada em cada amostra a expressão do gene constitutivo GAPDH também foi avaliada.

Os resultados dos três experimentos foram semelhantes e estão representados nas figuras abaixo (Figuras 19 e 20):

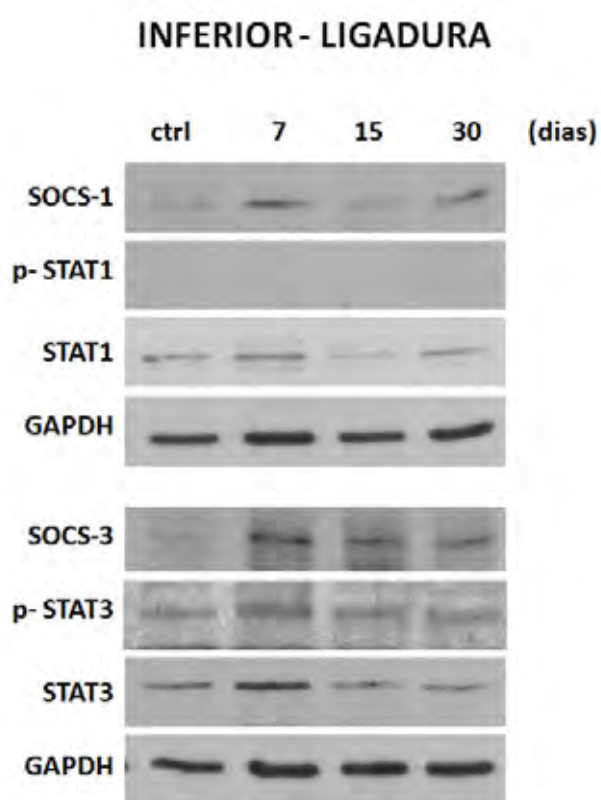


FIGURA 19 - Imagens representativas de 1 dos 3 experimento independentes realizados. As colunas indicam os diferentes períodos avaliados.

Os resultados apresentados na figura acima demonstram que no modelo de indução por ligadura a expressão protéica de SOCS1 e SOCS3, está aumentada já a partir dos 7 dias de indução, sendo que nos períodos seguintes a expressão diminui, porém se mantém maior em relação a expressão no grupo

controle. É interessante notar que os níveis de expressão de STAT1 e STAT3 em sua forma total e fosforilada (p-STAT3) acompanham os níveis de expressão de SOCS1 e -3 respectivamente. A ativação de p-STAT1 não foi detectada em nenhum dos experimentos realizados.

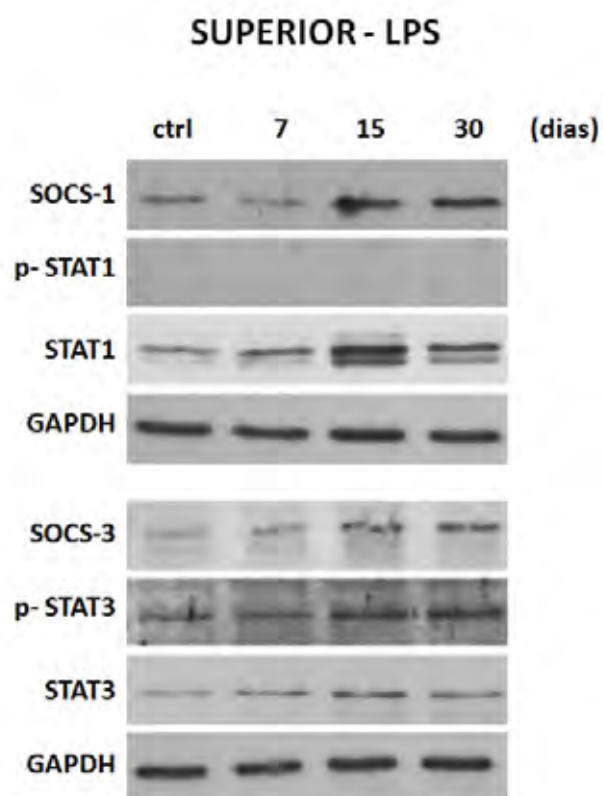
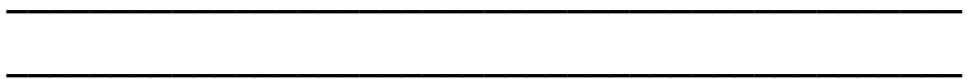


FIGURA 20 - Imagens representativas de 1 dos 3 experimento independentes realizados. As colunas indicam os diferentes períodos avaliados.

Os resultados apresentados na figura acima demonstram que no modelo de indução por LPS a expressão protéica de SOCS1 e SOCS3, está aumentada a partir dos 15 dias, sendo que no período seguinte a expressão se mantém elevada, em relação aos animais do grupo controle e do grupo de 7 dias. É interessante notar que os níveis de expressão de STAT1 e STAT3 em sua forma

total e fosforilada (p-STAT3) acompanham os níveis de expressão de SOCS1 e -3 respectivamente. A ativação de p-STAT1 não foi detectada em nenhum dos experimentos realizados.

DISCUSSÃO



DISCUSSÃO

Os modelos animais de indução de periodontite já estão estabelecidos na literatura e ajudam no entendimento da patogênese da doença periodontal^{23,56}, sendo que as informações derivadas destes estudos podem ser úteis no entendimento de diversas condições inflamatórias de caráter crônico. Dois dos modelos mais utilizados são: colocação de ligadura nos primeiros molares e injeção de LPS diretamente na gengiva¹⁵. A utilização do LPS para indução de reabsorção óssea periodontal é um método bastante utilizado na literatura e visa possibilitar a avaliação da expressão dos genes de interesse após estímulo inicial limitado ao *toll-like receptor*. Optamos por utilizar LPS de *Escherichia coli*, agonista de TLR-4, já que diversos estudos demonstram que SOCS1 é regulador negativo de TLR-4⁴⁷⁻⁴⁸. Embora o modelo de indução por LPS tenha demonstrado eficácia, *in vivo* e *in vitro*, na indução da expressão de mediadores inflamatórios que induzem a inflamação crônica resultando em destruição óssea, o modelo de indução por ligadura é considerado por muitos autores, como mais representativo da periodontite em humanos. Na doença periodontal induzida por ligadura, além da possibilidade de participação de um estímulo mecânico na indução da resposta inflamatória, o acúmulo de microrganismos viáveis e naturalmente presentes na espécie animal (em contraste a modelos de monoinfecção utilizando microrganismos presentes em humanos, mas não em roedores), implica na participação de diferentes antígenos ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*), como toxinas e

produtos do metabolismo microbiano, CpG DNA, flagelos e peptídeoglicanos. Embora a indução por ligadura possa representar mais apropriadamente a situação clínica da doença periodontal no humano, a complexidade dos antígenos envolvidos interagindo com diferentes receptores e levando à ativação de diversas vias de sinalização intracelular dificulta a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de destruição do tecido conjuntivo e ósseo. Assim, para efeito comparativo, optamos por utilizar estas 2 metodologias de indução.

Para caracterização do perfil inflamatório nos diferentes modelos de indução bem como nos diferentes períodos avaliados, em nosso estudo, foi feita avaliação de RNAm de diferentes mediadores com atividade proinflamatória e antiinflamatória. O perfil de expressão destes mediadores acompanhou a intensidade do processo inflamatório verificado pela estereometria e a perda óssea durante a progressão da doença periodontal experimental nos dois modelos analisados. Observamos que no modelo de ligadura a expressão dos mediadores RANKL, IL-6 e TNF- α foi mais intensa aos 7 dias de indução, sugerindo uma maior intensidade inicial de agressão (verificada pela estereometria e pela área de reabsorção óssea), com característica de resposta mais aguda. Sendo que nos períodos seguintes a inflamação diminuiu progressivamente e a perda óssea segue uma progressão significativa, porém mais lenta, acompanhando a diminuição na expressão de RNAm dos mediadores. Já no modelo de LPS o pico de expressão destes mediadores ocorreu aos 15 dias, acompanhado pelo pico de intensidade do infiltrado inflamatório e de uma “aceleração” na perda óssea, sendo que aos 30

dias os níveis dos mediadores proinflamatórios TNF- α e IL-6, bem como a intensidade da inflamação e a perda óssea se mantiveram elevadas em relação ao grupo controle. Estes dados estão de acordo com os resultados encontrados na literatura que demonstram o papel destes mediadores na indução de reação inflamatória e na reabsorção óssea alveolar na doença periodontal^{27,37,43,58}.

Em relação à citocina antiinflamatória IL-10, houve uma tendência de aumento ao longo dos 30 dias do período experimental em ambos os modelos (LPS e ligadura), sendo esta tendência atenuada no modelo de LPS. IL-10 regula a produção e diferenciação de células B e seu aumento interfere na modulação da resposta imune⁶⁷. Sendo assim a doença periodontal passa para um “caráter” mais crônico caracterizado pela redução da intensidade da agressão no modelo de ligadura aos 30 dias, onde a expressão de IL-10 atingiu o nível mais elevado. Além disso, IL-10, em células precursoras de osteoclastos, inibe a osteoclastogênese induzida por RANKL⁴⁴, e pode ser uma citocina importante na recuperação da homeostase do processo de doença periodontal associado ao equilíbrio microbiota/hospedeiro⁶⁰. Os dados encontrados na literatura corroboram os resultados encontrados em nosso trabalho quando observamos que, apesar das diferenças anatômicas, a área que recebeu injeções de LPS apresentou perda óssea mais severa que a área que recebeu ligadura ao final do período experimental de 30 dias.

Ainda em relação à expressão de RNA dos mediadores inflamatórios, é interessante observar que a intensidade da modulação de IL-6 e TNF- α (representada pela magnitude do “*fold-change*” em relação aos respectivos

controles sem doença) foi notavelmente maior no modelo de LPS, suportando os achados de maior severidade de inflamação e de perda óssea das análises histológicas e medidas de reabsorção óssea, enquanto a intensidade da regulação de IL-10 foi superior no modelo de ligadura, suportando a observação que no modelo de LPS a agressão ao hospedeiro é mais intensa e sustentada durante o período experimental.

A presença de intenso infiltrado inflamatório e reabsorção óssea verificada aos 7 dias de indução por ligadura pode ser, ao menos parcialmente, atribuído ao trauma mecânico gerado com a colocação da mesma. Já a redução do processo inflamatório e desaceleração da reabsorção óssea aos 30 dias, podem ser devidas ao deslocamento do tecido gengival apicalmente, na tentativa de afastar-se da agressão e recuperar o espaço biológico. Após a colocação da ligadura, esta não foi reposicionada apicalmente à medida que ocorria a migração apical da margem gengival, havendo assim um maior distanciamento entre os tecidos periodontais e o estímulo agressor, o que proporcionou a diminuição da intensidade da agressão. Já no modelo de indução por LPS as repetidas injeções, realizadas 3x/semana, mantinham a intensidade da agressão. Estas diferenças nos quadros inflamatórios, atribuídas às metodologias empregadas, influenciaram diretamente nos resultados deste trabalho. Sendo assim, foi possível observar diferenças significativas na expressão de SOCS1 e -3, nos diferentes modelos avaliados.

Nos resultados obtidos em nosso estudo, ambos os modelos experimentais de indução de doença periodontal utilizados demonstram aumento

na expressão de SOCS1 e -3, tanto em nível de RNAm quanto em nível protéico, em comparação aos níveis de expressão observados nos animais do grupo controle. As proteínas SOCS são reguladoras negativas da sinalização inflamatória gerada por TLRs e citocinas pró-inflamatórias e atenuam a transdução do sinal como parte de um “*feedback*” negativo que inibe a resposta ao estímulo seguinte. Portanto, de acordo com nossos resultados, a expressão de SOCS geralmente é ausente ou mínima em tecidos saudáveis, e sua expressão diferencial em tecidos inflamados pode determinar o resultado da reação inflamatória². Ambos SOCS1 e -3 são reguladores negativos de mecanismos imune inato e adaptativo na artrite inflamatória⁶⁸, e sua deficiência resulta no aumento da destruição tecidual^{16,17}. O nível aumentado de SOCS encontrado nos animais dos grupos experimentais é coerente com os dados da literatura que demonstram que a expressão de SOCS1 e -3 é induzida frente a estímulos inflamatórios e a presença de citocinas com atividade inflamatória presentes em sítios periodontais doentes como é o caso de IL-6, INF- γ e TNF- α ^{19,22,25}. Além disso, estudos realizados em biópsias gengivais retiradas de pacientes com gengivite ou periodontite crônica demonstraram aumento de expressão de SOCS1 e -3 quando comparados com grupo controle sem a doença²¹. De fato, as mudanças quantitativas e qualitativas no biofilme oral de condições saudáveis para condições doentes são bem estabelecidas, e resultam em intenso desafio antigênico o que pode levar a uma indução na expressão de SOCS.

Uma vez que a expressão de SOCS pode ser regulada por diversos mediadores inflamatórios⁵¹, a severidade do processo inflamatório presente nos

tecidos periodontais pode influenciar a produção de SOCS por diferentes tipos celulares. Este fato foi observado em nossos resultados, que demonstraram que o perfil de expressão de SOCS em nível protéico acompanhou a severidade do processo inflamatório e a perda óssea durante a progressão da doença periodontal. Sendo assim, no modelo de ligadura, já aos 7 dias ocorreu pico de expressão protéica de SOCS1 e -3, sendo que nos períodos seguintes esta expressão foi diminuída, mas manteve-se maior que a expressão no grupo controle. Já no modelo de indução por LPS, o pico ocorreu aos 15 dias e os níveis se mantiveram altos no período de 30 dias. Desta forma foi possível constatar uma importante correlação entre a expressão de SOCS, a intensidade do processo inflamatório e densidade de células inflamatórias, sugerindo a participação destas células na cinética de expressão de SOCS.

Diversos estudos demonstram que a função predominante de SOCS é impedir que o sinal gerado pela ligação da citocina ao receptor ative STAT^{2,71}. Através de um mecanismo de regulação negativo, o aumento da atividade de STAT, leva a um aumento da expressão de SOCS na tentativa de diminuir a ativação da via JAK/STAT e conseqüentemente a injúria excessiva nos tecidos do hospedeiro⁵⁴. De forma interessante e de acordo com a literatura em ambos os modelos apresentados em nosso estudo, os níveis de expressão protéica de SOCS1 e -3 acompanharam os níveis de expressão protéica de STAT1 e -3 nas formas total e fosforilada (apenas p-STAT3), respectivamente. De fato, o aumento na produção de mediadores inflamatórios por células residentes e inflamatórias na presença de estímulo nocivo, no caso ligadura ou LPS, leva a um aumento na

sinalização intracelular e maior ativação de fatores de transcrição²⁰. Estes dados sugerem que o aumento da expressão de SOCS1 e SOCS3 pode representar um mecanismo de regulação negativa em resposta ao aumento, respectivamente, da atividade de STAT1 e STAT3, e pode ser um mecanismo importante na regulação da expressão de genes relacionados à resposta imune/inflamatória e à reabsorção óssea durante a doença periodontal.

Estudos *in vivo* demonstram a importância de SOCS3 na modulação negativa da via de sinalização gp130/STAT3 no processo de cicatrização de feridas. A ausência de SOCS3 leva a um aumento na atividade de STAT3 causando retardo na cicatrização^{39,72}. Em nosso estudo, verificamos que mesmo após 30 dias da colocação da ligadura, os níveis de RNAm e protéicos de SOCS3 se mantiveram elevados. De fato, a migração do epitélio e o afastamento do estímulo agressor, levaram a diminuição do infiltrado inflamatório, acompanhada de uma tentativa de reparação caracterizada pela tendência ao aumento de fibroblastos e colágeno verificado por estereometria. Estes resultados sugerem que SOCS3 também pode participar na cicatrização dos tecidos periodontais.

Os resultados encontrados neste estudo sugerem relação entre os níveis de expressão de SOCS e a progressão e severidade da doença periodontal experimental em ratos. A compreensão do papel de SOCS na regulação negativa da sinalização celular da via JAK/STAT e no desenvolvimento das doenças periodontais pode fornecer bases para futuras intervenções terapêuticas buscando a limitação do processo inflamatório.

Novos estudos visando manipular a expressão de SOCS1 e -3 para avaliar os efeitos sobre a modulação da resposta inflamatória e da rede de citocinas estabelecida nas doenças inflamatórias são necessários para determinar a participação de SOCS na progressão e severidade das doenças periodontais.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Este estudo demonstra a cinética de expressão, em nível de RNAm e protéico, de SOCS1 e SOCS3 em dois diferentes modelos experimentais de doença periodontal induzida, sugerindo um possível envolvimento desta família de proteínas na regulação do processo inflamatório responsável pela destruição periodontal.

O perfil de expressão protéica de SOCS1 e -3 acompanharam a ativação dos fatores de transcrição STAT1 e -3 durante o curso da doença periodontal e foram distintos nos modelos de LPS e ligadura. Além disso, esta expressão parece estar relacionada positivamente ao grau da reabsorção óssea alveolar e à severidade do processo inflamatório nos tecidos moles na doença periodontal em ratos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

1. Ahmed ST, Ivashkiv LB. Inhibition of IL-6 and IL-10 signaling and Stat activation by inflammatory and stress pathways. *J Immunol.* 2000; 165: 5227-37.
2. Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22: 503-29.
3. Alexander WS, Starr R, Fenner JE, Scott CL, Handman E, Sprigg NS, et al. SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell.* 1999; 98: 597-608.
4. Baetz A, Frey M, Heeg K, Dalpke AH. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins indirectly regulate toll-like receptor signaling in innate immune cells. *J Biol Chem.* 2004; 279: 54708-15.
5. Bartold PM, Marshall RI, Haynes DR. Periodontitis and rheumatoid arthritis: a review. *J Periodontol.* 2005; 76 Suppl 11: 2066-74.
6. Blank VC, Pena C, Roguin LP. STAT1, STAT3 and p38MAPK are involved in the apoptotic effect induced by a chimeric cyclic interferon-alpha2b peptide. *Exp Cell Res.* 2010; 316: 603-14.

*De acordo com o estilo Vancouver.

7. Bode JG, Ludwig S, Freitas CA, Schaper F, Ruhl M, Melmed S, et al. The MKK6/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is capable of inducing SOCS3 gene expression and inhibits IL-6-induced transcription. *Biol Chem*. 2001; 382: 1447-53.
8. Bode JG, Nimmesgern A, Schmitz J, Schaper F, Schmitt M, Frisch W, et al. LPS and TNFalpha induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages. *FEBS Lett*. 1999; 463: 365-70.
9. Boyle K, Zhang JG, Nicholson SE, Trounson E, Babon JJ, McManus EJ, et al. Deletion of the SOCS box of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in embryonic stem cells reveals SOCS box-dependent regulation of JAK but not STAT phosphorylation. *Cell Signal*. 2009; 21: 394-404.
10. Briscoe J, Guschin D, Rogers NC, Watling D, Muller M, Horn F, et al. JAKs, STATs and signal transduction in response to the interferons and other cytokines. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1996; 351: 167-71.
11. Caruso R, Stolfi C, Sarra M, Rizzo A, Fantini MC, Pallone F, et al. Inhibition of monocyte-derived inflammatory cytokines by IL-25 occurs via p38 Map kinase-dependent induction of Socs-3. *Blood*. 2009; 113: 3512-9.
12. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*. 2008; 79: 1569-76.

13. Crespo A, Filla MB, Russell SW, Murphy WJ. Indirect induction of suppressor of cytokine signalling-1 in macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide: partial role of autocrine/paracrine interferon-alpha/beta. *Biochem J.* 2000; 349(Pt 1): 99-104.
14. Dalpke AH, Opper S, Zimmermann S, Heeg K. Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs. *J Immunol.* 2001; 166: 7082-9.
15. de Aquino SG, Guimaraes MR, Stach-Machado DR, da Silva JA, Spolidorio LC, Rossa C, Jr. Differential regulation of MMP-13 expression in two models of experimentally induced periodontal disease in rats. *Arch Oral Biol.* 2009; 54: 609-17.
16. de Hooge AS, van de Loo FA, Koenders MI, Bennink MB, Arntz OJ, Kolbe T, et al. Local activation of STAT-1 and STAT-3 in the inflamed synovium during zymosan-induced arthritis: exacerbation of joint inflammation in STAT-1 gene-knockout mice. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 2014-23.
17. Egan PJ, Lawlor KE, Alexander WS, Wicks IP. Suppressor of cytokine signaling-1 regulates acute inflammatory arthritis and T cell activation. *J Clin Invest.* 2003; 111: 915-24.
18. Ehling C, Lai WS, Schaper F, Brenndorfer ED, Matthes RJ, Heinrich PC, et al. Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF-alpha involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade. *J Immunol.* 2007; 178: 2813-26.

19. Ejeil AL, Gaultier F, Igondjo-Tchen S, Senni K, Pellat B, Godeau G, et al. Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression? *J Periodontol.* 2003; 74: 196-201.
20. Garcia de Aquino S, Manzolli Leite FR, Stach-Machado DR, Francisco da Silva JA, Spolidorio LC, Rossa C, Jr. Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. *Life Sci.* 2009; 84: 745-54.
21. Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Martins W, Jr., Silva JS. Expression of suppressors of cytokine signaling in diseased periodontal tissues: a stop signal for disease progression? *J Periodontal Res.* 2006; 41: 580-4.
22. Geivelis M, Turner DW, Pederson ED, Lamberts BL. Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *J Periodontol.* 1993; 64: 980-3.
23. Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13: 17-34.
24. Gibson FC, 3rd, Genco CA. *Porphyromonas gingivalis* mediated periodontal disease and atherosclerosis: disparate diseases with commonalities in pathogenesis through TLRs. *Curr Pharm Des.* 2007; 13: 3665-75.

25. Gorska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 1046-52.
26. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2008; 79 Suppl 8: 1585-91.
27. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2003; 74: 391-401.
28. Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 2008; 35: 89-105.
29. Hayashi T, Kaneda T, Toyama Y, Kumegawa M, Hakeda Y. Regulation of receptor activator of NF-kappa B ligand-induced osteoclastogenesis by endogenous interferon-beta (INF-beta) and suppressors of cytokine signaling (SOCS). The possible counteracting role of SOCSs- in IFN-beta-inhibited osteoclast formation. *J Biol Chem.* 2002; 277: 27880-6.
30. Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene.* 2000 May 15; 19: 2548-56.
31. Howlett M, Menheniott TR, Judd LM, Giraud AS. Cytokine signalling via gp130 in gastric cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1793: 1623-33.

32. Johnston JA, O'Shea JJ. Matching SOCS with function. *Nat Immunol.* 2003; 4: 507-9.
33. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.* 2002; 8: 147-59.
34. Kinjyo I, Hanada T, Inagaki-Ohara K, Mori H, Aki D, Ohishi M, et al. SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation. *Immunity.* 2002; 17: 583-91.
35. Kirkwood KL, Cirelli JA, Rogers JE, Giannobile WV. Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2007; 43: 294-315.
36. Kirkwood KL, Rossa C, Jr. The potential of p38 MAPK inhibitors to modulate periodontal infections. *Curr Drug Metab.* 2009; 10: 55-67.
37. Krajewski AC, Biessei J, Kunze M, Maersch S, Perabo L, Noack MJ. Influence of lipopolysaccharide and interleukin-6 on RANKL and OPG expression and release in human periodontal ligament cells. *APMIS.* 2009; 117: 746-54.
38. Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol.* 2003; 4: 1169-76.
39. Linke A, Goren I, Bosl MR, Pfeilschifter J, Frank S. The Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS)-3 Determines Keratinocyte Proliferative and Migratory Potential during Skin Repair. *J Invest Dermatol.* 2010; 130: 876-85.

40. Liu R, Bal HS, Desta T, Krothapalli N, Alyassi M, Luan Q, et al. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *J Dent Res.* 2006; 85: 510-4.
41. Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 Suppl 6: 57-71.
42. Madonna S, Scarponi C, De Pita O, Albanesi C. Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IFN-gamma inflammatory signaling in human keratinocytes by sustaining ERK1/2 activation. *FASEB J.* 2008; 22: 3287-97.
43. Manolagas SC. Role of cytokines in bone resorption. *Bone.* 1995; 17 Suppl 2: 63S-7S.
44. Mohamed SG, Sugiyama E, Shinoda K, Taki H, Hounoki H, Abdel-Aziz HO, et al. Interleukin-10 inhibits RANKL-mediated expression of NFATc1 in part via suppression of c-Fos and c-Jun in RAW264.7 cells and mouse bone marrow cells. *Bone.* 2007; 41: 592-602.
45. Morita Y, Naka T, Kawazoe Y, Fujimoto M, Narazaki M, Nakagawa R, et al. Signals transducers and activators of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor-1 (SSI-1)/suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) suppresses tumor necrosis factor alpha-induced cell death in fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 5405-10.
46. Murray PJ. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol.* 2007; 178: 2623-9.

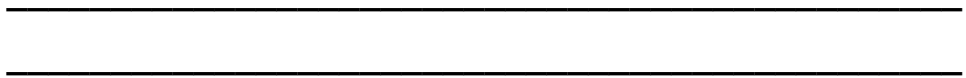
47. Naka T, Fujimoto M, Tsutsui H, Yoshimura A. Negative regulation of cytokine and TLR signalings by SOCS and others. *Adv Immunol.* 2005; 87: 61-122.
48. Nakagawa R, Naka T, Tsutsui H, Fujimoto M, Kimura A, Abe T, et al. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity.* 2002; 17: 677-87.
49. Nicholson SE, De Souza D, Fabri LJ, Corbin J, Willson TA, Zhang JG, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 6493-8.
50. Niemand C, Nimmesgern A, Haan S, Fischer P, Schaper F, Rossaint R, et al. Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. *J Immunol.* 2003; 170: 3263-72.
51. O'Shea JJ, Murray PJ. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity.* 2008; 28: 477-87.
52. Odze RD, Marcial MA, Antonioli D. Gastric fundic gland polyps: a morphological study including mucin histochemistry, stereometry, and MIB-1 immunohistochemistry. *Hum Pathol.* 1996; 27: 896-903.
53. Ohishi M, Matsumura Y, Aki D, Mashima R, Taniguchi K, Kobayashi T, et al. Suppressors of cytokine signaling-1 and -3 regulate osteoclastogenesis in the presence of inflammatory cytokines. *J Immunol.* 2005; 174: 3024-31.

54. Rakesh K, Agrawal DK. Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 2005; 70: 649-57.
55. Roberts AW, Robb L, Rakar S, Hartley L, Cluse L, Nicola NA, et al. Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling 3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98: 9324-9.
56. Rogers JE, Li F, Coatney DD, Rossa C, Bronson P, Krieder JM, et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2007; 78: 550-8.
57. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68: 320-44.
58. Safavi KE, Rossomando EF. Tumor necrosis factor identified in periapical tissue exudates of teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 1991; 17: 12-4.
59. Sasaki A, Yasukawa H, Suzuki A, Kamizono S, Syoda T, Kinjyo I, et al. Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells.* 1999; 4: 339-51.
60. Sasaki H, Okamatsu Y, Kawai T, Kent R, Taubman M, Stashenko P. The interleukin-10 knockout mouse is highly susceptible to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss. *J Periodontal Res.* 2004; 39: 432-41.

61. Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, et al. Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest.* 2001; 108: 1781-8.
62. Slots J, Genco RJ. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J Dent Res.* 1984; 63: 412-21.
63. Starr R, Hilton DJ. Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *Bioessays.* 1999; 21: 47-52.
64. Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature.* 1997; 387: 917-21.
65. Stoiber D, Kovarik P, Cohnen S, Johnston JA, Steinlein P, Decker T. Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor IFN-gamma. *J Immunol.* 1999;163: 2640-7.
66. Terstegen L, Gatsios P, Bode JG, Schaper F, Heinrich PC, Graeve L. The inhibition of interleukin-6-dependent STAT activation by mitogen-activated protein kinases depends on tyrosine 759 in the cytoplasmic tail of glycoprotein 130. *J Biol Chem.* 2000; 275: 18810-7.

67. Volk H, Asadullah K, Gallagher G, Sabat R, Grutz G. IL-10 and its homologs: important immune mediators and emerging immunotherapeutic targets. *Trends Immunol.* 2001; 22: 414-7.
68. Wong PK, Egan PJ, Croker BA, O'Donnell K, Sims NA, Drake S, et al. SOCS-3 negatively regulates innate and adaptive immune mechanisms in acute IL-1-dependent inflammatory arthritis. *J Clin Invest.* 2006; 116: 1571-81.
69. Wormald S, Hilton DJ. Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem.* 2004; 279: 821-4.
70. Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, Murakami M, Chinen T, Aki D, et al. IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat Immunol.* 2003; 4: 551-6.
71. Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7: 454-65.
72. Zhu BM, Ishida Y, Robinson GW, Pacher-Zavisin M, Yoshimura A, Murphy PM, et al. SOCS3 negatively regulates the gp130-STAT3 path in mouse skin wound healing. *J Invest Dermatol.* 2008; 128: 1821-9.

ANEXOS



ANEXO 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara.

FACULDADE DE ODONTOLOGIA



Proc. CEEA nº 23/2007

Araraquara, 18 de fevereiro de 2008

Senhores Pesquisadores:

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA desta Faculdade reunido em 18/02/2008, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Estudo da participação de reguladores negativos endógenos da atividade de STAT1 e STAT3 (SOCS1, SOCS3, PIAS1 e PIAS3) na doença periodontal experimental" (Proc. CEEA nº 23/2007) **AUTORIZA** a realização da pesquisa, ficando a aprovação vinculada à apresentação do **RELATÓRIO FINAL**.

Atenciosamente.

Profa. Dr. ELENY BALDUCCI ROSLINDO
Vice-Coordenadora no exercício da Coordenadoria do CEEA

Ao
Prof. Dr. CARLOS ROSSA JUNIOR
a/c João Antonio Chaves de Souza
Pesquisador Responsável
Nesta

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 30 de março de 2010.

JOÃO ANTONIO CHAVES DE SOUZA