



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Fernando Augusto Cintra Magalhães

**Efeito protetor da Interleucina-4 na reabsorção óssea periodontal induzida por
agonista de TLR2 (Pam2CSK4)**

Araraquara

2018



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Fernando Augusto Cintra Magalhães

Efeito protetor da Interleucina-4 na reabsorção óssea periodontal induzida por agonista de TLR2 (Pam2CSK4)

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara, para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Biologia Craniofacial e Biomateriais

Orientador: Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza

Co orientador: Prof. Dr. João Antônio Chaves de Souza

Araraquara

2018

Magalhães, Fernando Augusto Cintra

Efeito protetor da Interleucina-4 na reabsorção óssea periodontal induzida por agonista de TLR2 (Pam2CSK4) / Fernando Augusto Cintra Magalhães. -- Araraquara: [s.n.], 2018

84 f. ; 30 cm

Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza

Coorientador: Prof. Dr. João Antonio Chaves de Souza

1. Reabsorção óssea 2. Inflamação 3. Osteoclastos 4. Interleucina-4
I. Título

Fernando Augusto Cintra Magalhães

Efeito protetor da Interleucina-4 na reabsorção óssea periodontal induzida por agonista de TLR2 (Pam2CSK4)

Comissão julgadora

Tese para obtenção do Grau de Doutor em Odontologia

Presidente e orientador: Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza

2º Examinador: Prof. Dr. Lucas Tabajara Parreiras e Silva

3º Examinador: Prof. Dr. Marcelo Donizetti Chaves

4º Examinador: Prof. Dr. Rafael Scaf de Molon

5º Examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Araraquara, 2 de março de 2018

DADOS CURRICULARES

Fernando Augusto Cintra Magalhães

NASCIMENTO: 18/08/1977 – Santo André – SP

FILIAÇÃO: Joaquim Augusto Magalhães e Vera Lúcia de Godói Cintra Magalhães

1996/2000 Graduação em Odontologia – Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho – Campus de São José dos Campos

2002/2004 Curso de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, Área de concentração em Patologia, nível Mestrado – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

2007/2009 Professor do Curso de Odontologia da Faculdade de Imperatriz – FACIMP- Maranhão

2009/ até o presente Professor do Curso de Enfermagem da Universidade Federal do Maranhão – Campus de Saúde e tecnologia – Imperatriz- Maranhão

Dedico este trabalho...

ao João, meu pequeno, que um dia você perceba que tudo foi por você e que a leitura desta obra, no devido tempo, sirva para despertar a curiosidade acerca de tudo e de todos que tornaram esse sonho possível. Muito obrigado pelo novo mundo que você me apresentou

Ao meu núcleo familiar, meu ninho, meu alicerce. Sra. Vera, Sr. Augusto, Sr. Felipe e, minha princesa, Sra. Carla, sem vocês nada disso teria sido possível. Foram anos de incentivo, compreensão e apoio em todas as áreas. Não existem palavras para exprimir o que foram esses anos, por isso simplifico dedicando meu melhor

Em especial, a minha companheira/amiga/parceira/tudo, Carlinha, pela paciência e apoio em todos os momentos que só nós conhecemos o preço. Que cada centelha de dedicação seja válida. Esse trabalho e esses anos de dedicação também são seus

Aos meus avós, Rosa, Lelé (*in memoriam*), Joana (*in memoriam*) e Pedro (*in memoriam*). Pedrão, como você me pediu, seu neto será Doutor de verdade

Em especial agradeço...

Ao meu orientador, **Prof Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza**

Muito obrigado pela oportunidade, pelos conhecimentos compartilhados, por ter aceitado o desafio e depositado toda a confiança e responsabilidade de ser o pioneiro dentre seus orientados. Aprendemos juntos, crescemos juntos e como toda família, concordamos e discordamos de algumas coisas. Obrigado por tudo, por ter me ensinado que o “não” é necessário e que os erros percebidos, servem para a valorização do aprendizado do certo. Que seu caminho seja longo, prazeroso e produtivo sempre. Obrigado pela honra de ter participado da história do GPBO e de todos que construíram esse sonho com você. Respeito e gratidão sempre;

Aos amigos **João Antonio, Guilherme Oliveira e Rafael Molon**, pelo reconhecimento do muito que aprendi, que veio da habilidade que vocês possuem de dividirem o que sabem. Que a carreira de vocês seja plena e que possamos carregar essa amizade anos a fio, dentro e fora do meio acadêmico;

Aos meus pais, **Vera e Augusto**

Muito obrigado ainda é pouco perto de toda a luta, dedicação e apoio de vocês ao longo desses 40 anos, nada disso seria possível sem vocês. Tudo é pouco perto do muito que sinto;

À minha família **Carla e João Felipe**, muito obrigado por todo apoio, companheirismo, críticas, broncas, noites tristes e felizes. Muito de tudo que está aqui foi para vocês e por vocês. O futuro é incerto, mas o presente é abundante em amor em sua essência.

AGRADECIMENTOS

Ser grato a alguém reflete a nobreza de se reconhecer no outro, de dar e oferecer apoio. O número de pessoas a quem somos gratos, reflete a arduidade e nobreza do trabalho executado, mas também nos conduz ao ato falho da negligência e esquecimento como fruto do estado mental que nos encontramos na fase final de uma tese. Por isso, abro meus agradecimentos àqueles que não foram nominalmente citados, mas, que de alguma maneira, contribuíram com esse trabalho de forma direta, ou indireta, contribuindo com a manutenção da saúde mental deste que escreve. A vocês, muito obrigado;

Depois dessa breve abertura, não poderia de ser grato à **UNESP**, minha segunda casa. Ao meu campus mãe, a **Faculdade de Odontologia de São José dos Campos** e ao campus que fecha minha formação, a **Faculdade de Odontologia de Araraquara**, na figura de todos aqueles que fazem a máquina girar e os sonhos possíveis, minha mais sincera e plena gratidão. Se um dia o João escolher ter uma de vocês no caminho, completar-se-á o mais lindo dos ciclos;

Ao programa de pós-graduação em Odontologia, representado aqui na figura de seu coordenador, **Prof Joni Augusto Cirelli**, muito obrigado pela oportunidade, compreensão e por todo o apoio que permitiu a conclusão deste trabalho;

À FAPESP – Jovem Pesquisador (2014/05283-3), Projeto CAPES/Pesquisador Visitante (Processo Ciência Sem Fronteiras 080/2012) e CNPq (Universal 14/2014), cujos financiamentos permitiram a realização de todos os experimentos que compuseram esta obra;

A Universidade Federal do Maranhão e todos os amigos que lá fiz, em particular aos **Sr. Fernando Carvalho**, vice-reitor, cuja dedicação impulsiona a qualificação de professores e funcionários;

Aos funcionários e servidores da FOAr, representados na figura da nossa querida **Nina** e **José Fernando**, o reconhecimento do quanto vocês são essenciais, muito obrigado por tudo e por toda atenção e palavras de carinho na hora do desespero;

A todos os professores da disciplina de Patologia da FOAr, **Profa Denise**, **Prof Carlos Alberto** e **Prof Luis Spolidório**. Obrigado pela oportunidade de dividir com vocês aulas, laboratórios, a hora do café e conversas engrandecedoras;

Às secretárias do Departamento de Fisiologia e Patologia, **Sras Silvana** e **Carla**, por toda expertise e dedicação que permitem o fluxo harmônico das disciplinas e atividades de extensão. Muito obrigado;

Aos professores da disciplina de Periodontia da FOAr, **Prof Carlos Rossa**, **Joni** e **Adriana** por todo apoio e dedicação de vocês nestes anos de idas e vindas ao 2º andar;

Aos amigos que fiz no laboratório de Patologia, **Juliana Pirola** e **José Zuanon**, por todo apoio técnico, logístico e “psiquiátrico”. Todo conhecimento compartilhado, todos os cafés e momentos de “ombro amigo” que tornaram essa jornada mais leve, são dignos da minha mais eterna, pura e sincera gratidão. Mantenham sempre essa luz, muitos se beneficiarão dela;

Aos funcionários do Biotério Central, **Beatriz** e **Celso**, muito obrigado por toda prontidão, carinho e dedicação. A logística administrada por vocês é o que torna nossos experimentos possíveis;

Aos membros do Comitê de Ética e seus funcionários, representado na figura da **Sra Fernanda**, por toda dedicação e paciência;

A todos da Biblioteca da FOAr, em especial a **Sra Ceres**, por todo apoio e profissionalismo ímpar;

A secretaria de pós-graduação, representados pelo **Srs José Alexandre e Cristiano** por toda dedicação, apoio e profissionalismo. Meus reconhecimentos por todo trabalho que demos a vocês;

Aos membros do ERAPI e do STAEPE, **Renan, Alexandre e Luis Rocatelli** por toda dedicação e logística que tornam as coisas factíveis, meu muito obrigado;

A minha família maranhense, representado pelo meu sogro e amigo **Evandro**, obrigado pelo apoio e pela compreensão dos anos de ausência. Nominar todos seria impossível, mas saibam que todos moram no meu coração;

Aos meus irmãos **Marcelo Chaves e Marcelo Sores**, pela parcela de culpa que vocês carregam em toda minha formação profissional e, principalmente, pessoal. O apoio e experiência de vocês foi imprescindível para que esses anos longe se tornassem mais leves. Que a vida nos reserve muita história pela frente. Muito obrigado;

A todos os membros do Laboratório de Patologia Experimental, em especial às amigas **Ester, Karla, Fernanda, Diana e Maria Luisa**, por todo convívio, apoio e companheirismo. Contem sempre comigo;

Aos frequentadores e usuários do Laboratório multiusuário da Periodontia, em especial aos amigos **Marcell** e a nossa “anjo da guarda” **Claudia**, muito obrigado por todo apoio e solicitude exemplares;

Aos amigos que levo para a vida, **Jonleno, Luis Carlos, Vinicius, Tiago e Camila**, muito obrigado pela oportunidade de crescer junto com vocês e ter compartilhado todas as alegrias, dores, ansiedades frustrações e vitórias que acompanham a pós-graduação. Que a vida nos permita encontros frequentes em qualquer canto do país;

E, por fim, a toda família GPBO, **Glaucia, Thais, Leticia, Larissa, Aline e Jorge**, juntos dividimos expectativas, vitórias, frustrações e mais uma miríade de sentimentos que acompanham o convívio familiar. Vocês são espetaculares, poucas são as palavras capazes de exprimir a gratidão que tenho por cada um de vocês. Minha amizade e gratidão plena. Muito obrigado por TUDO.

**“Sua tarefa é descobrir o seu
trabalho e então, com todo o
coração, dedicar-se a ele”**

Siddhartha Gautama – Buddha

Magalhães FAC. Efeito protetor da Interleucina-4 na reabsorção óssea periodontal induzida por agonista de TLR2 (Pam2CSK4) [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

A periodontite é resultado do desequilíbrio entre o biofilme bacteriano e a resposta imune do hospedeiro. Componentes bacterianos, como o lipopolissacarídeo (LPS) e as lipoproteínas, são reconhecidos pelo sistema imune e desencadeiam a produção de citocinas que auxiliam no combate à infecção, mas também induzem a destruição tecidual. A participação do LPS na destruição óssea já é bem estabelecida, porém o papel das lipoproteínas na periodontite permanece carente de investigação. Na periodontite, citocinas pró-inflamatórias participam do processo de destruição do tecido ósseo. Neste processo, são secretadas também citocinas osteoprotetoras. Dentre elas, a interleucina 4 (IL-4) é reconhecida pela propriedade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α . O papel protetor de IL-4 na osteoclastogênese e na doença periodontal induzida por lipoproteína ainda não foi investigado. Nosso estudo foi dividido em dois capítulos. No capítulo 1, hipotetizamos que a lipoproteína sintética Pam2CSK4 (PAM2) poderia induzir a reabsorção óssea periodontal. Para isso, foram utilizados camundongos C57bl/6, que receberam injeções a cada 2 dias, por 24 dias, do veículo, LPS de *Escherichia coli* ou PAM2, entre o primeiro e segundo molar superior. Após o período experimental, os animais foram eutanasiados e destinados à análise por microCT, análise histológica e imunohistoquímica para marcação dos osteoclastos. A PAM2 apresentou a capacidade de induzir a perda óssea alveolar, recrutamento de células inflamatórias e aumento do número de osteoclastos em comparação com o grupo controle. Utilizando-se do modelo desenvolvido no capítulo 1, no estudo do capítulo 2, analisamos o papel da IL-4 na reabsorção decorrente da atividade de lipoproteína. Foi observado a diminuição da perda óssea alveolar linear em análise microtomográfica. Com a finalidade de observar os efeitos isolados nas células ósseas, foram realizados estudos *in vitro*, com osteoblastos semeados em meio contendo veículo, PAM2, IL-4 ou a combinação de PAM2 e IL-4. Após 24 horas foi extraído para análise a expressão de RANKL, por RT qPCR. Macrófagos de medula óssea foram expostos a MSCF e RANKL por 24h e posteriormente, tratadas com veículo, PAM2, IL-4 ou a combinação de PAM2 e IL-4. Após 72 horas, as células foram coradas com TRAP e as células TRAP+ multinucleadas foram contadas, ou lisadas para análise de marcas fenotípicas de osteoclastos por RT qPCR. Em osteoblastos, PAM2 induziu a expressão de RANKL efeito que foi parcialmente bloqueado por IL-4. Em osteoclastos, PAM2 induziu um aumento do número de osteoclastos e a expressão de todas as marcas fenotípicas de osteoclastos (*Ctsk*, *Nfat2* e *RANK*) e este aumento também foi suprimido por IL-4. Concluímos que IL-4 tem potencial osteoprotetor pela inibição da expressão de RANKL por osteoblastos e pela inibição direta da osteoclastogênese.

Palavras chave: Reabsorção óssea. Inflamação. Osteoclastos. Interleucina-4.

Magalhães FAC. The protective effect of interleukin-4 in periodontal bone loss induced by TLR2 agonist (Pam2CSK4) [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

The pathogenesis of periodontitis is a result of imbalance between the bacterial biofilm and the host immune response. Bacterial components such as lipopolysaccharide (LPS) and lipoproteins, activate the immune system leading to periodontal destruction. The participation of LPS in periodontal bone destruction is well established, but there is a lack of information about the role of lipoproteins in periodontitis. In the pathogenesis of periodontitis, these molecular patterns are recognized by host immune system and trigger the production of cytokines that participate of antimicrobial response, but also induce tissue destruction. On the other hand, antiinflammatory cytokines produced by Th2 cells, such as IL-4, have an osteoprotective phenotype. The role of IL-4 in lipoprotein-induced periodontitis was not yet investigated. Thus, this thesis was divided in two chapters. In chapter 1, we investigated the role of lipoproteins in the pathogenesis of periodontitis in mice. In this study, we hypothesized that the synthetic lipoprotein Pam2CSK4 (PAM2) can induce periodontal bone resorption. C57bl / 6 mice received bilateral injections every other day for 24 days of: vehicle, *Escherichia coli* LPS or PAM2, between the first and second upper molars. Twenty-four hours after the last injection, the mice were euthanized and the jaw bones were scanned for micro computed tomography, decalcified and processed for histological analysis and stained for tartrate-resistant acid phosphatase, phenotypic marker for osteoclasts. PAM2 induced alveolar bone loss, demonstrated by reduction of bone volume, recruitment of inflammatory cells and increased number of osteoclasts in comparison to the control group. The cytokine interleukin 4 (IL-4) has an osteoprotective phenotype. In chapter 2, we investigated the protective role of IL-4 in lipoprotein-induced periodontitis. Using the new model of alveolar bone resorption by PAM2, we analysed the role of IL-4 in vivo, and demonstrated a reduction of alveolar bone loss in a microtomographic and histological study. To confirm the findings, in vitro studies were performed on osteoblasts isolated from the calvarial bones from neonatal mice and seeded on media containing vehicle, PAM2, IL-4 or the combination of PAM2 and IL-4. After 24 hours, the RNA was extracted for analysis of expression of the *Tnfsf11*, gene that encodes RANKL, by real-time PCR. Differentiated macrophages from mouse bone marrow were exposed to MSCF and RANKL for 24h and after this period the cells were treated with vehicle, PAM2, IL-4 or the combination of PAM2 and IL-4. After 72 hours of exposure, the cells were stained for TRAP+ cells counting, or lysed for analysis of phenotypic markers of osteoclasts by real-time PCR. In osteoblasts, PAM2 induced expression of *Tnfsf11* effect that was suppressed by IL-4. PAM2 induced an increase in the number of osteoclasts and this increase was also suppressed by IL-4. Expression of all phenotypic markers of osteoclasts (*Ctsk*, *Nfat2* and *RANK*) increased in cells treated with PAM2, effect that was also partially blocked by IL-4. In conclusion, IL-4 protects from alveolar bone loss caused by lipoprotein injection, by a mechanism that involves inhibition of RANKL expression by osteoblasts and direct inhibition of osteoclastogenesis.

Keywords: Bone loss. Inflammation. Osteoclasts. Interleukin-4.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 O Tecido Ósseo.....	13
1.2 Osteoblastos.....	14
1.3 Osteócitos.....	15
1.4 Osteoclastos.....	15
1.5 Metabolismo Ósseo	16
1.6 Osteoimunologia.....	17
1.7 Interleucina 4	19
1.8 Reabsorção Óssea Induzida por Componentes Bacterianos....	20
1.9 Modelos Animais.....	21
2 PROPOSIÇÃO	25
2.1 Proposição específica da publicação 1.....	25
2.2 Proposição específica da publicação 2.....	25
3 PUBLICAÇÕES	26
3.1 Publicação 1	26
3.2 Publicação 2	47
4 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	69
APÊNDICE A – Material e Métodos	75
ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética	83
ANEXO B – Comprovante de Submissão da Publicação 1.....	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Tecido Ósseo

O osso é um tecido conjuntivo altamente especializado composto por uma porção mineralizada associada a uma matriz proteica^{1, 2, 3}. A porção mineral representa cerca de 70% do tecido ósseo e basicamente é composta por cálcio (Ca) e fosfato (PO) estruturados na forma de cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, arranjados em uma matriz composta essencialmente por água (cerca de 5%) e 25% de proteínas, onde cerca de 90-95% destas, são colágeno tipo I e o restante, proteínas não colagenosas como a osteocalcina, osteopontina e osteonectina^{1, 2}.

O tecido ósseo é o principal constituinte do sistema esquelético, servindo de suporte e proteção à órgãos vitais¹. Aloja a medula óssea, responsável pela formação dos elementos figurados do sangue (hematopoiese), também serve de ancoradouro a músculos e tendões auxiliando no processo de equilíbrio e locomoção constituindo um sistema de alavancas que amplia as forças da contração muscular⁴. Além dessas funções, os ossos exercem a importante função de estocagem de cálcio e fosfato, dentre outros íons, liberando-os ou armazenando de maneira orquestrada de modo a manter a concentração desses íons nos líquidos corporais, responsabilizando-se pela homeostase dos mesmos^{4, 5}.

Estruturalmente, no tecido ósseo, pode ser observada uma porção periférica mais compacta, conhecida como cortical óssea, formada por osso compacto, e internamente, são observadas traves mineralizadas, interligadas e com menor densidade, formando uma rede trabecular, conhecida como porção medular, composta por osso esponjoso^{1, 2}. Os ossos são recobertos interna e externamente por uma cápsula fibrosa rica em células osteogênicas, o endósteo e o periósteo, respectivamente².

Dada sua composição mineral, a estrutura microscópica do osso pode ser estudada por desgaste ou desmineralização². As duas técnicas permitem a análise da inter-relação entre as células e a matriz óssea². A estrutura microscópica revela a arquitetura do tecido, com a presença de unidades lamelares concêntricas de matriz mineralizada depositadas ao redor de um canal que abriga um discreto feixe vâsculo-nervoso, caracterizando o sistema de Harvers². Essas unidades comunicam-se entre si por meio de canais interligantes, os canais de Volkman². Associados, essas estruturas permitem a nutrição do aparato ósseo^{2, 4}.

Embriologicamente, o tecido ósseo é oriundo de células mesenquimais indiferenciadas e sua arquitetura se dá a partir do processo de formação óssea, a chamada ossificação². O processo de ossificação pode ser dividido em dois tipos, a endocondral e a intramembranosa^{2, 4}. Na ossificação endocondral, são formados os ossos longos a partir de um molde cartilaginoso onde reconhece-se uma porção cilíndrica longa que caracteriza a diáfise, que contem em suas extremidades duas porções, as epífises^{2, 4}. Entre as epífises e a diáfise, há a presença de uma porção cartilaginosa, a cartilagem de crescimento, que promove o alongamento do osso durante a fase de desenvolvimento do organismo mesmo depois da calcificação da diáfise^{2, 4}. Nos seres humanos, após a adolescência, esse processo cessa, a cartilagem de crescimento calcifica cessando o crescimento em comprimento². A ossificação intramembranosa se dá no interior de membranas de tecido conjuntivo e origina ossos chatos e irregulares como os ossos da face, e contribui para o crescimento em espessura dos ossos longos^{2, 4}.

Na ultraestrutura histológica, são distinguíveis 3 grupos celulares responsáveis pelo processo de formação, reabsorção e neoformação do tecido ósseo: os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos, componentes primordiais e essenciais no desenvolvimento e manutenção da integridade óssea⁴.

1.2 Osteoblastos

Os osteoblastos são células derivadas de células tronco mesenquimais da medula óssea das quais originam-se também os adipócitos e os condrócitos^{6, 7} (Figura 1). São os responsáveis pela formação da matriz proteica (essencialmente colágeno do tipo I) e posterior mineralização do tecido ósseo por ação, principalmente, da fosfatase alcalina^{8, 9}.

A diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos é dependente da ação das proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), da expressão, principalmente de osterix (OSX) e RUNX 2¹⁰. Quando maduros, os osteoblastos são os responsáveis pela expressão do ligante do receptor ativador NF- κ B (RANKL) e da osteoprotegerina (OPG), substâncias envolvidas com a diferenciação e inibição da formação dos osteoclastos, respectivamente^{8, 10, 11}. Quando inativos na superfície óssea, permanecem como células de recobrimento superficial que podem ser ativadas a partir dos mesmos estímulos que regulam positivamente os precursores de osteoblastos^{12, 13}. Somado à propriedade de formar osso, os osteoblastos têm a

propriedade de controlar a formação e a ativação dos osteoclastos assim como dar origem aos osteócitos¹³.

1.3 Osteócitos

Osteócitos são células originadas a partir da diferenciação de osteoblastos, que se encontram circundados por tecido mineralizado⁴ (Figura 1). Estas células apresentam prolongamentos citoplasmáticos que se interligam formando uma trama complexa de comunicação^{13, 14}.

Participam ativamente da regulação do metabolismo ósseo, atuando como mecano sensores com a capacidade de atuar como fonte de RANKL no processo de osteoclastogênese¹⁵ e como estimulador para a diferenciação de osteoblastos, orquestrando a remodelação óssea, ou seja, promovendo o equilíbrio entre a reabsorção e a neoformação óssea no metabolismo ósseo eutrófico^{14, 16, 17}.

1.4 Osteoclastos

Os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas, que tem como função exclusiva promover a reabsorção de tecido mineralizado, principalmente, de tecido ósseo^{2, 4, 11} (Figura1). São derivadas de monócitos/macrófagos, oriundos dos precursores hematopoiéticos da medula óssea¹⁸. Sua diferenciação é dependente do fator estimulador de colônia de macrófagos (MCSF) e do ligante do receptor ativador NF- κ B (RANKL) expresso principalmente por osteoblastos, osteócitos e linfócitos T ativados, que se ligam aos receptores ativadores NF- κ B (RANK), presente nos pré-osteoclastos resultando no recrutamento dos fatores associados ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAFs) 2, 5 ou 6, promovendo a fusão celular e ativação dos osteoclastos^{19, 20}.

A diferenciação de osteoclastos em resposta à expressão de RANKL é regulada pela expressão de osteoprotegerina (OPG) pelos osteoblastos, que tem a propriedade de impedir a interação RANKL-RANK por ligar-se ao RANKL, se tornado assim a chave regulatória para a diferenciação de osteoclastos^{21, 22, 23}(Figura 2).

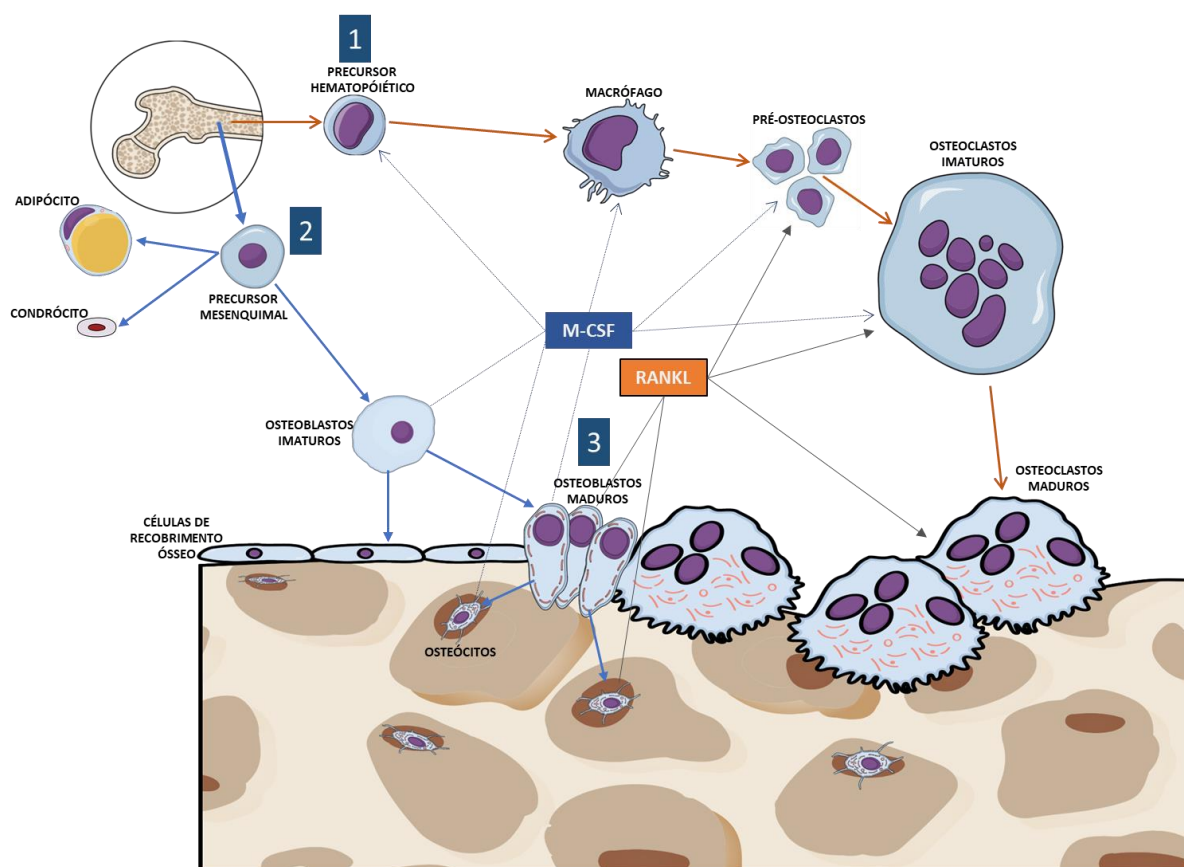
Figura 1 – Origem das células do tecido ósseo

Figura esquemática ilustrando a origem das células do tecido ósseo. Precursores hematopoiéticos (1) que expressam o receptor para M-CSF sofrem diferenciação em Macrófagos, originando os pré-osteoclastos, que expressam RANK e dão origem aos Osteoclastos. Precursores mesenquimais (2) dão origem aos osteoblastos, que por sua vez, dão origem aos osteócitos. Osteócitos e osteoblastos (3) contribuem com a osteoclastogênese uma vez que são capazes de produzir RANKL e MCSF.

Fonte: Elaboração própria

1.5 Metabolismo Ósseo

Desde o desenvolvimento embrionário e ao longo da vida de um vertebrado, o tecido ósseo é continuamente reabsorvido e neoformado e essa dinâmica continua, caracteriza o metabolismo ósseo⁴. Fruto da interação entre as células ósseas em condições fisiológicas, o processo de remodelação óssea é responsável pela manutenção do volume, da massa do tecido ósseo, assim como pela homeostase mineral^{22, 24}.

A remodelação é regulada pela ação de hormônios osteotrópicos como o hormônio da paratireoide (PTH) e pela ação da vitamina D3 que possuem a propriedade de estimular

osteoblastos a expressarem o receptor ativador NF- κ B (RANKL), citocina essencial na diferenciação e ativação dos osteoclastos que, por sua vez, participam da regulação e ativação dos osteoblastos no ciclo que caracteriza o processo de remodelação^{3, 25}.

Porém, a atividade do tecido ósseo pode se tornar ainda mais complexa e dinâmica, uma vez que a interação com componentes bacterianos e com o sistema imune, também são capazes de induzir efeitos na atividade das células ósseas, estimulando ou inibindo a atividade celular podendo resultar em alterações de forma ou volume ósseo^{25, 26}. Da necessidade de se compreender os fenômenos envolvidos nesse processo, floresceu o campo da osteoimunologia^{27, 28, 29, 30}.

1.6 Osteoimunologia

O sistema imune compreende um mecanismo de alta complexidade que tem a função de promover a primeira linha de defesa do organismo contra agentes externos com potencial patogênico^{29, 30}. Ele é equipado com múltiplas sobreposições e interações com o maquinário de outros sistemas, onde destacamos a sua interação com o tecido ósseo^{28, 29, 30}.

A osteoimunologia visa compreender os mecanismos celulares e moleculares pelos quais o sistema imune é capaz de regular, positiva ou negativamente, as células do tecido ósseo em resposta a diferentes estímulos, internos e externos^{30, 31, 32}. Um exemplo da influência de estímulos internos pode ser observada em doenças autoimunes como a artrite reumatoide, que leva ao desequilíbrio da atividade de células ósseas, dada ativação do sistema imunológico, sem a presença de um agente agressor específico, levando à ativação anormal e prolongada do sistema imune, o que induz a destruição óssea pela potencialização da atividade dos osteoclastos^{33, 34}. Fenômenos onde o metabolismo ósseo sofre a interferência de condições patológicas, é característica da modelação óssea^{25, 26}.

Em diferentes processos de modelação, além das condições autoimunes, são observados o envolvimento do processo inflamatório local induzido por componentes bacterianos, fenômeno bem evidenciado nos estudos da perda óssea alveolar observada nas periodontites^{35, 36}. Nestes casos, o envolvimento de tipos celulares como os linfócitos T ativados (LTa), contribuem para o aumento da expressão de RANKL e consequentemente, estimulam positivamente a osteoclastogênese^{33, 34, 37, 38}. A participação dos LTa é um dos mecanismos que explicita a interação entre o sistema ósseo e o sistema imune^{29, 30}.

Outra evidência é notada em osteoblastos e osteoclastos que podem ser estimulados por citocinas pró inflamatórias que sinalizam através da glicoproteína 130 (gp130), um transdutor de sinal utilizado por diferentes membros da Interleucina 6 (IL-6), que inclui o IL-6, IL11, a oncostatina M (OSM), o fator neurotrófico ciliar (CTNF) e a cardiotrofina 1 (CT-1)³⁸. Os próprios componentes do sistema RANKL-RANK são membros das superfamílias do fator de necrose tumoral (TNF) e receptores de TNF²⁶, respectivamente, o que justifica a observação do aumento do número de osteoclastos próximos à sítios inflamatórios^{38, 39}.

O TNF em si, representa um potente agente osteoclastogênico, e a administração sistêmica de lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), um componente de destaque nas perdas ósseas periodontais presentes na periodontite, é capaz de desencadear a osteoclastogênese indiretamente, pela liberação do TNF e sua ligação com o receptor TNF p55^{40, 41, 42}. Tanto os LPS assim como citocinas pró inflamatórias a exemplo da Interleucina 1 (IL-1) e o TNF α , estão envolvidas diretamente no processo de osteoclastogênese em um eixo independente do eixo RANK-RANKL na presença do fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) e de ocorrência em condições inflamatórias^{43, 44}.

Em contrapartida, citocinas que apresentam fenótipo osteoprotetor, associadas a processos crônicos, são classificadas como anti-inflamatórias e foram identificadas com a capacidade de inibir a osteoclastogênese^{38, 45}. Desta classe de citocinas osteoprotetoras, a IL-4 recebe um destaque especial, uma vez apresenta a capacidade de inibir a osteoclastogênese por diferentes mecanismos, de forma direta e indireta^{46, 47, 48}.

Figura 2 – Regulação dos osteoclastos pelo sistema RANK-RANKL-OPG

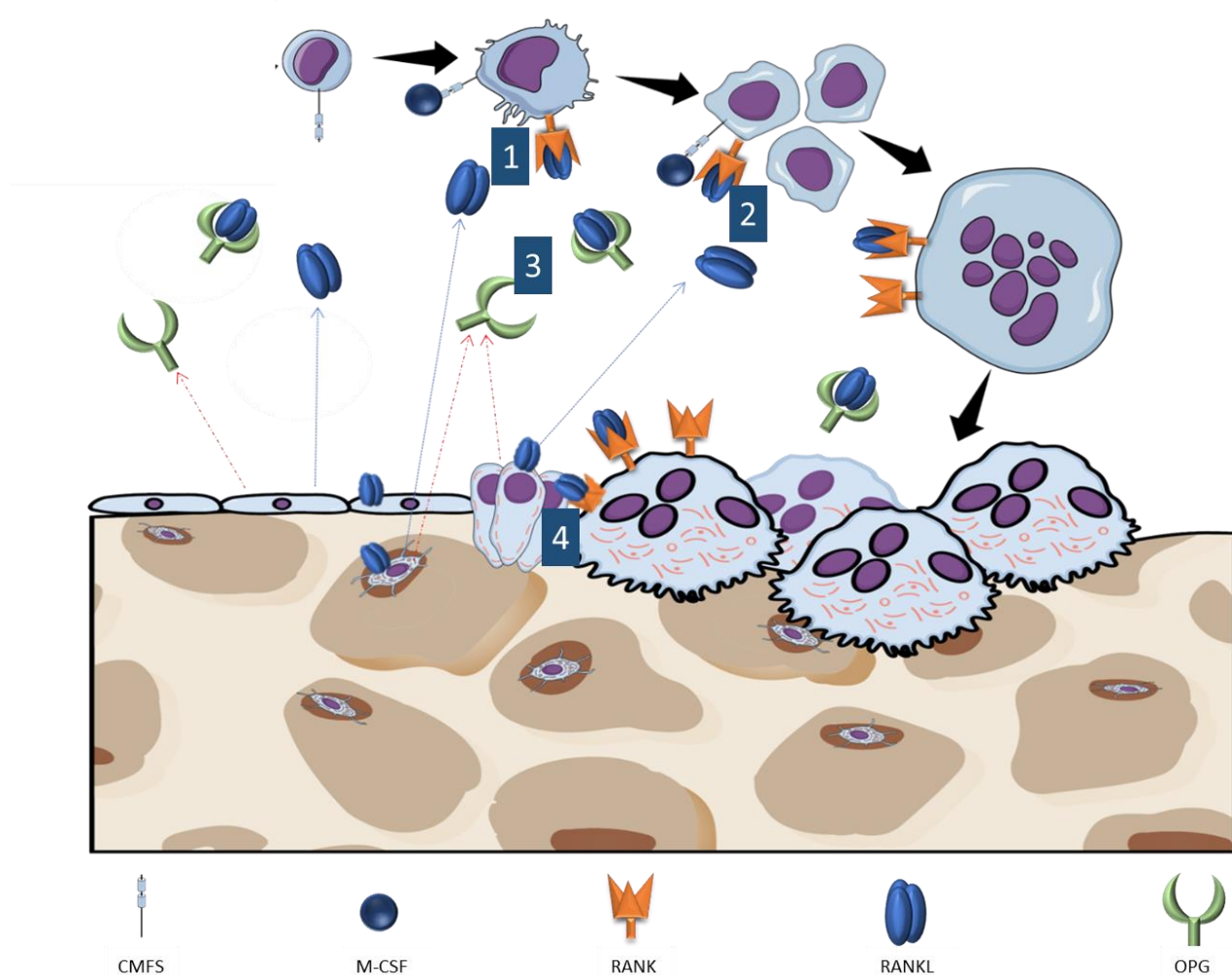


Figura esquemática da regulação da osteoclastogênese pelo Sistema RANK-RANKL-OPG. Macrófagos da medula óssea expressam receptores para MCSF e RANKL (1); osteoblastos e osteócitos secretam RANKL, a citocina chave para diferenciação de osteoclastos (2) que também pode ativar osteoclastos pelo contato célula a célula (4). Por outro lado, estas células também secretam OPG, que se liga a RANKL, impedindo a ligação deste ao RANK, assim regulando negativamente (3).

Fonte: Elaboração própria

1.7 Interleucina 4

Dentre as citocinas anti-inflamatórias, a interleucina 4 (IL-4) possui ação pleiotrópica e é secretada por linfócitos Th2 ativados, mastócitos, eosinófilos e basófilos (Figura 3). Assim como a IL-13, apresenta atividade moduladora do processo inflamatório. Essa citocina atua principalmente sobre a função de linfócitos e macrófagos, modulando a expressão de

citocinas pró inflamatórias como a IL-1, o TNF α e a IL-6 (Figura 3)^{49, 50, 51}. As respostas biológicas associadas à ação da IL-4 se dão a partir da interação com dois tipos de receptores⁴⁸. Os receptores tipo 1 são reconhecidos por estarem presentes em células derivadas de precursores hematopoiéticos e são compostos pelo heterodímero do receptor IL-4 α (IL-4R α) com uma cadeia γ comum (γ c), e se liga de maneira específica à IL-4. O receptor tipo 2, presente em derivados dos precursores mesenquimais e também por macrófagos de medula óssea, é composto por uma subunidade IL-4R α e uma unidade IL13R α , permitindo a ligação com a IL-13 e a IL-4 o que explica os efeitos biológicos compartilhados pelas duas interleucinas^{38, 45, 48}. Por serem derivados de células que expressam receptores de IL-4, tanto osteoblastos quanto osteoclastos possuem a capacidade de responder a estímulo com esta citocina³⁸.

O metabolismo ósseo pode ser afetado diretamente pela IL-4 através da regulação da osteoclastogênese, tanto pela ação indireta sobre osteoblastos, quanto a ação direta sobre precursores de osteoclastos⁴⁸ e/ou osteoclastos maduros, reduzindo de maneira significativa, a reabsorção óssea (Figura 4)⁵². Os mecanismos diretos de ação da IL-4 sobre os osteoclastos, podem envolver a inibição de NF- κ B⁴⁷, diminuição da expressão da enzima fosfatase ácida târtarato-resistente (TRAP)^{52,53} (Figura 4), a inibição das vias NF κ B, JNK, ERK e p38 quinase, reconhecidamente importantes na osteoclastogênese dependente de RANKL^{22, 54}. Os mecanismos indiretos sobre os osteoblastos, podem envolver a inibição da síntese de prostaglandinas, o aumento da produção de OPG e a inibição da produção de RANKL (Figura 3)^{46, 48}. Ainda neste contexto, a IL-4 atua também sobre células residentes, como fibroblastos gengivais, inibindo a expressão de citocinas da família da IL-6 e a expressão dos receptores de cininas⁵⁵. Mesmo com os estudos que possibilitaram a descrição destes mecanismos, o papel da IL-4 sobre a expressão de RANKL em células estimuladas por componentes estruturais bacterianos como o LPS ou lipoproteínas, permanece carente de investigação.

1.8 Reabsorção Óssea Induzida por Componentes Bacterianos

Componentes bacterianos, pertencentes ao grupo dos PMAPs, são reconhecidos por receptores tipo *Toll* (TLRs), presentes tanto em células inflamatórias quanto em células ósseas. Estes componentes podem atuar diretamente em receptores presentes nos pré osteoclastos e osteoclastos ou indiretamente, quando há ativação dos receptores presentes nos

osteoblastos e estes passam a expressar mais RANKL, favorecendo a osteoclastogênese decorrente de processos infecciosos no tecido ou em suas adjacências^{56, 57, 58}.

Dentre os PMAPs, os lipopolissacarídeos (LPS) são os mais amplamente estudados. É descrito que ativam a resposta imune inata do hospedeiro, desencadeando a expressão de citocinas inflamatórias e o recrutamento celular, através da ativação do receptor tipo *Toll* 4 (TLR4)^{38, 59, 60, 61}. Na doença periodontal, este mecanismo possui particular importância na etiopatogênese do processo^{56, 62, 63, 64}. Estudos recentes demonstram que a ativação de outro membro dos TLRs, o TLR2, desempenha um papel significativo na reabsorção óssea induzida por *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), um agente etiológico fortemente associado ao desenvolvimento da periodontite^{65, 66, 67}. Foi observado que camundongos deficientes para TLR2, ficaram protegidos da perda óssea alveolar induzida pela infecção oral por *P. gingivalis*⁶⁸; ⁶⁹. A ativação de TLR2 por *P. gingivalis* parece estar associada à expressão de lipoproteína por esta bactéria, que foi inicialmente isolada como contaminante da preparação de LPS^{65, 66}. Apesar de ter sido demonstrado o efeito sistêmico de lipoproteínas na reabsorção óssea⁵⁶, não existem modelos de estudo para avaliar a participação destes componentes bacterianos na doença periodontal.

1.9 Modelos Animais

Modelos animais são utilizados para o estudo dos mecanismos envolvidos na patogênese das mais diversas doenças, inclusive da periodontite se tornando uma importante fonte de informação a respeito das peculiaridades que envolvem a interação hospedeiro-microbiota^{70, 71}.

A principal característica dos modelos experimentais é a possibilidade de criar condições que mimetizem as observadas no desenvolvimento da periodontite em humanos, permitindo assim a abordagem focada em mecanismos específicos associados à instalação e progressão da periodontite^{71, 72, 73}. Diferentes modelos já foram propostos, dentre os que usam roedores, os ratos têm sido amplamente usados, porém o uso de camundongos apresenta algumas vantagens, uma vez que é possível manipular suas características genéticas permitindo foco nos mecanismos que envolvem células, mediadores e vias de sinalização específicos associados ao desenvolvimento da periodontite^{72, 73, 74}.

Diferentes métodos vêm sendo empregados na indução da periodontite nos modelos animais, onde podemos destacar a gavagem, a indução de infecção por bactérias ativas, a

instalação de ligaduras e as injeções localizadas⁷⁵. Cada um destes métodos empregados na indução, oferecem modelos específicos com a capacidade de assumir características de determinados componentes do processo patofisiológico que descreve o curso das doenças periodontais⁷¹.

A injeção localizada de bactérias ou componentes patogênicos das mesmas diretamente no tecido gengival do palato, é um modelo usado na indução da doença periodontal^{71, 74, 75}. Este método desencadeia uma inflamação dos tecidos periodontais capaz de deflagrar diferentes mediadores químicos que resultam em respostas celulares, responsáveis pela perda óssea nas imediações da zona alvo da injeção^{74, 75}. Uma ampla gama de substâncias é usada nos modelos de indução por injeção localizada, sendo a mais usada e amplamente estudada o lipopolissacarídeo (LPS), que induz perda óssea próxima a área da injeção^{63, 66}. Recentemente, uma forma sintética de lipoproteína, a Pam2CSK4, foi sintetizada e vem sendo usada em diferentes estudos in vitro e in vivo, explorando efeitos e vias de sinalização que podem levar à reabsorção óssea^{56, 76}. A literatura demonstra que o LPS de diversas bactérias tem a capacidade de estimular a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea in vivo e in vitro devido à ativação dos receptores tipo TLR4^{77, 78}, enquanto as lipoproteínas agem através da ativação do TLR2⁶⁸, ambos expressos por células do tecido ósseo e com a capacidade de estimular a perda óssea no curso da doença^{60, 68}.

Uma vez que lipoproteínas bacterianas são consideradas um importante fator de virulência devido a sua potente atividade imuno-estimuladora^{56, 58, 79, 80} propomos usar o Pam2CSK4, um agonista de TLR2 com o intuito de desenvolver um modelo de indução de doença periodontal*, que colabore na compreensão da ativação da via do TLR2 nas diferentes condições que envolvem a patogênese da doença periodontal.

*MAGALHÃES FAC, SOUZA J, OLIVEIRA G, MOLON R, SOUZA P. Lipoproteins induce periodontal destruction in mice. Material a ser publicado pelo Journal of Periodontology, Boston, EUA 2018.

Figura 3 – Produção e ação da IL-4

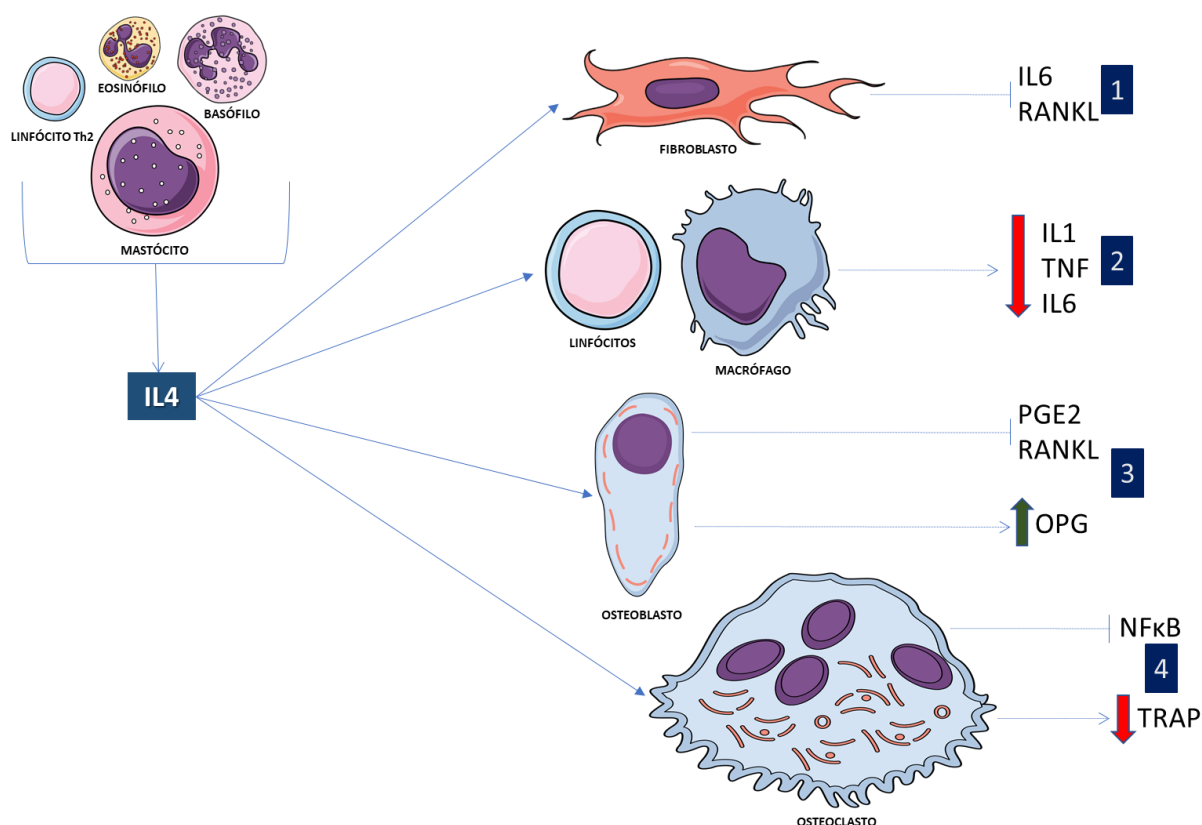
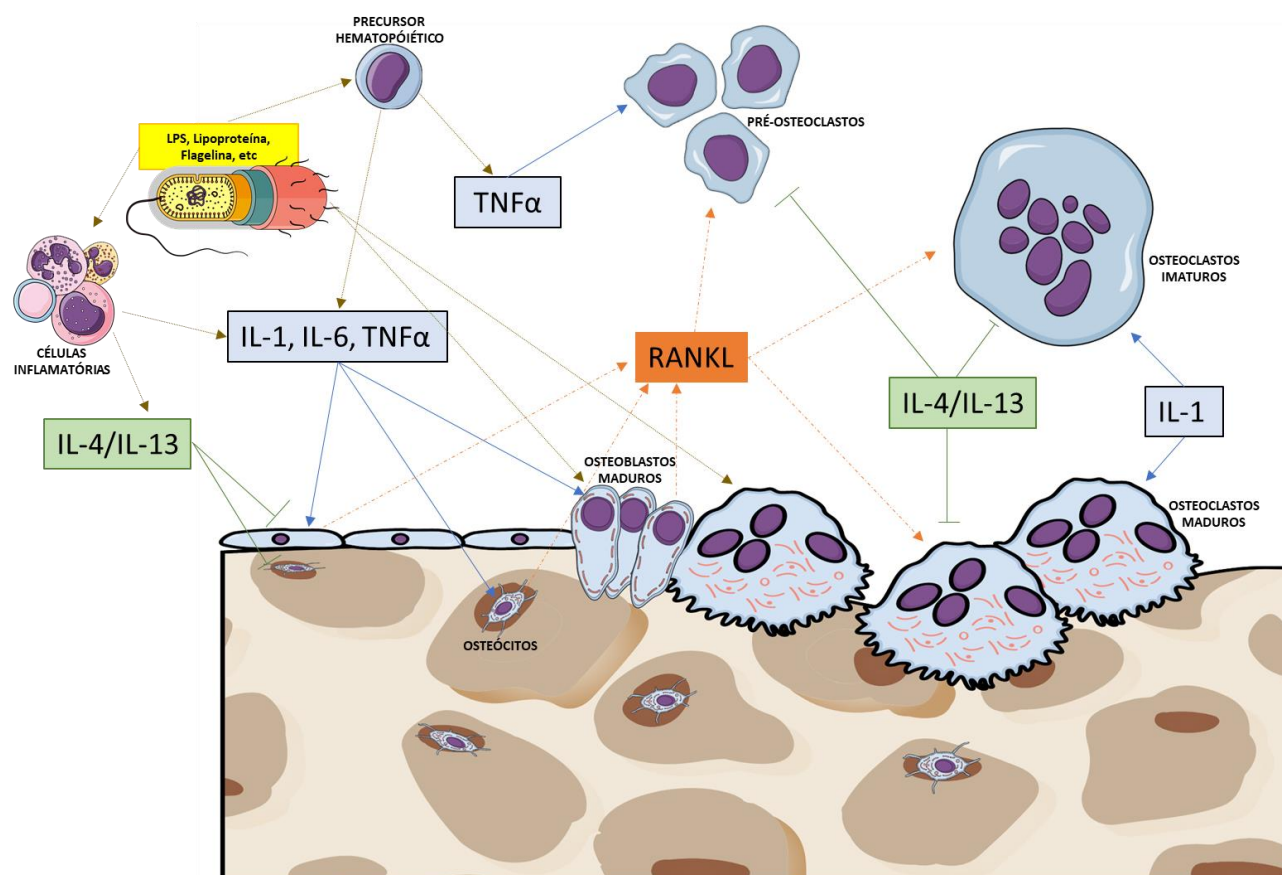


Ilustração esquemática da ação da IL-4 sobre células envolvidas direta ou indiretamente no metabolismo ósseo. Agindo sobre os fibroblastos (1), a IL-4 é capaz de inibir a produção de IL-6 e RANKL assim como diminuir a expressão de interleucinas de fenótipo osteolítico por parte dos linfócitos e macrófagos (2). Sobre os osteoblastos, a IL-4 inibe PGE2 e RANKL e estimula a produção de OPG (3) e diretamente sobre osteoclastos, é capaz de inibir NFκB e diminuir a expressão de TRAP; somados esses efeitos, temos exemplificado o potencial regulatório da IL-4 por ação direta e indireta na osteoclastogênese.

Fonte: Elaboração própria

Figura 4 – Regulação do metabolismo ósseo por componentes inflamatórios



Via de regulação da Osteoclastogênese a partir da interação das células ósseas com componentes inflamatórios. Interleucinas secretadas por um vasto número de células do processo inflamatório, a IL-1, IL-6 e $TNF\alpha$, podem estimular a produção de RANKL por osteoblastos e osteócitos ou agir diretamente sobre osteoclastos, regulando-os positivamente. Interleucinas com fenótipo anti-inflamatório, como IL-4 e IL-13, podem inibir a produção de RANKL por osteoblastos e osteócitos ou interferir diretamente sobre pré osteoclastos e osteoclastos.

Fonte: Elaboração própria

2 PROPOSIÇÃO

Uma vez evidenciada a importância das lipoproteínas bacterianas na inflamação e sua potente atividade imuno-estimuladora e seu envolvimento na fisiopatologia da reabsorção óssea periodontal^{56, 57, 58, 80, 81}, propomos estudar o possível efeito inibitório da IL-4 na reabsorção óssea alveolar induzida por lipoproteína.

Para isso estudo foi subdividido em 2 capítulos com objetivos específicos descritos a seguir:

2.1 Proposição Específica da Publicação 1

Propomos desenvolver um modelo experimental de reabsorção óssea alveolar em camundongos a partir da ativação do receptor TLR2 por lipoproteína (Apêndice A). Para isso, foi usada uma lipoproteína sintética, o Pam₂CSK₄, agonista do TLR2, envolvido na indução da reabsorção óssea em outros modelos^{56, 79}

2.2 Proposição Específica da Publicação 2

As lipoproteínas promovem a reabsorção óssea por mecanismos que envolvem a estimulação da diferenciação de osteoclastos, diretamente pela ativação do receptor TLR2 e, indiretamente, aumentando a expressão de RANKL pelos osteoblastos^{56, 79}. Estes mecanismos são passíveis da inibição pela ação do IL-4^{47, 82, 83}. Assim, neste estudo avaliamos o papel da IL-4 na reabsorção óssea alveolar induzida por lipoproteína. Avaliamos também os possíveis mecanismos envolvidos, estudando o papel da IL-4 na produção de RANKL e osteoclastogênese induzida por lipoproteínas (Apêndice A).

3 PUBLICAÇÕES

3.1 Publicação 1*

Lipoproteins induce periodontal destruction in mice.

Fernando Augusto Cintra Magalhães, DDS, MSc^{*,†} João Antonio Chaves de Souza, DDS, PhD[‡]

Guilherme Jose Pimentel Lopes de Oliveira, DDS, PhD[§] José Antonio Sampaio Zuanon, MSc^{||||}

Rafael Scaf de Molon, DDS, PhD[§] Pedro Paulo Chaves de Souza, DDS, PhD^{¶,a}

*Assistant Professor, Department of Nursing School, Federal University of Maranhao – UFMA, Imperatriz, Maranhao, Brazil

†PhD student, Department of Physiology and Pathology, São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araraquara, Sao Paulo, Brazil

‡Adjunct Professor, Department of Periodontology, Federal University of Goias - UFG, Goiania, Goias, Brazil

§Post-doctoral researcher, Department of Diagnosis and Surgery, São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araraquara Sao Paulo, Brazil

|||| Master degree Department of Physiology and Pathology, São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araraquara, Sao Paulo, Brazil

¶Associate Professor, Department of Physiology and Pathology, São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araraquara, Sao Paulo, Brazil

* Este artigo está de acordo com *Journal of Periodontology* no qual se encontra em fase de apreciação dos revisores (Anexo B).

Corresponding author:

Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza

School of Dentistry, Department of Physiology and Pathology

São Paulo State University (UNESP)

Araraquara, Rua Humaitá, 1680; 14801-903, Araraquara, SP, Brazil

Phone: +55 16 3301-6476; Fax: +55 16 3301-6300

E-mail: souza.ppc@foar.unesp.br

Word count: 2255

Number of figures: 3

Number of tables: 0

References: 37

Running title: Periodontitis induced by TLR2 agonist

Summary: Pam₂CSK₄, a TLR2 agonist, induces inflammation and periodontal bone loss in mice.

ABSTRACT

Background: Lipoproteins are important bacterial immunostimulating molecules capable of stimulating RANKL and osteoclast formation in vitro and in vivo. Although these molecules are present in periodontopathogenic bacteria, their role in periodontitis is not known. In this study, we used a synthetic molecule, Pam₂CSK₄ (PAM2) that mimics bacterial lipoprotein to investigate the effects of lipoproteins on periodontitis in mice.

Methods: C57BL6 mice were randomly divided into three experimental groups: 1) Negative control group: animals received vehicle injection; 2) Positive control group: animals received injection of *E. coli* lipopolysaccharide (LPS); 3) PAM2 group: animals received PAM2 injection. All injections were performed bilaterally every other day into the palatal mucosa between first and second molars. After twenty-four days, animals were euthanized to access alveolar bone volume (micro-CT), cellular and extracellular composition in the gingiva (stereometric analysis), and osteoclast numbers (TRAP staining).

Results: Treatment with PAM2, or LPS, induced gingival inflammation, as demonstrated by increased infiltration of inflammatory cells and enhanced angiogenesis associated with decreased amount of fibroblasts and extracellular matrix. Importantly, treatment with PAM2, similar to LPS, also resulted in increased number of TRAP+, multinucleated osteoclast and significant loss of alveolar bone.

Conclusions: Collectively, our data demonstrate that PAM2 can induce gingival inflammation and bone loss in mice, opening new possibilities to investigate the role of lipoproteins in the pathogenesis of periodontal disease.

Key Words: Bone; inflammation; lipoprotein; toll-like receptor (TLR); mice; periodontal disease; osteoclastogenesis

INTRODUCTION

Periodontitis, a polymicrobial infection disease, is characterized by the destruction of periodontal structures leading to long-term alveolar bone loss and loosening of teeth.¹ The current understanding of the etiopathogenesis of periodontitis claims that clinical features are a result of the unbalanced interaction between the bacterial biofilm present on the surface of teeth and the host immune-inflammatory response in the periodontium.^{2, 3} This response is initiated by the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), such as lipoproteins and lipopolysaccharide (LPS) present in Gram-negative bacteria.^{4, 5} The host immune system recognizes and responds to the PAMPs using different pathogen recognition receptors (PRRs) such as the Toll-like receptors (TLRs), leading to up-regulation of a wide variety of inflammatory mediators and, consequently, to an antimicrobial response.⁶⁻⁹

Animal models have been used for a better understanding of the mechanisms involved in the pathogenesis of periodontitis and provide important information on the inflammatory response associated with host-microbial interactions.^{1, 10-14} The main advantage of experimental models is the ability to isolate specific mechanisms, allowing the understanding of the pathogenesis of periodontitis in a more specific and controlled manner.^{11, 12} The possibility of genetic modifications makes the mouse an excellent model to study the host response in periodontitis and allows the comprehension of the role of different proteins and receptors in the recognition of microbes.¹⁰ On the other hand, the use of genetically modified bacteria and purified bacterial molecules allows the understanding of the role of specific PAMPs in the initiation of immune response.^{10, 15, 16}

Due to its ubiquitous presence in Gram-negative bacteria, the most studied PAMP is LPS^{10, 13, 17} and several studies show the importance of LPS-induced activation of TLR4 for periodontal breakdown. Many bacteria also contain lipoproteins as important virulence

factors due to their strong immunostimulatory activity.¹⁸ *Porphyromonas gingivalis* (P.g.) is recognized as an important pathogenic bacterium in human periodontitis. These bacteria also induce gingival inflammation and periodontal breakdown through activation of TLR2 in experimental models of periodontitis in mice¹⁹. We used, a synthetic lipopeptide, Pam₂CSK₄ (Pam2), known to mimic bacterial lipoprotein, to investigate the effect of local treatment with this compound on gingival inflammation and bone loss. We compared the effect of Pam2 with that of a well-characterized *Escherichia coli* LPS.^{10, 11, 13}

MATERIALS AND METHODS

Animal care

Mice and surgical procedures were handled according to the guidelines of the local Ethical Committee for Animal Care and Use (CEUA #11/2015). Animals were maintained in the animal facilities of the São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araraquara, (Araraquara, Sao Paulo, Brazil), with controlled temperature ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) and a 12-hour light/dark cycle. Mice were housed in plastic cages, fed a standard laboratory diet, and given water *ad libitum*.

LPS and PAM2 Injection Model

A total of twenty-one 10-week-old C57BL/6 male mice were used in this study. The animals were sedated with isoflurane* and received 3 μL local injections using a custom-designed 0.375-inch x 12-gauge needles attached to a 10 μL syringe[§]. The injections were performed into the palatal mucosa between first and second maxillary molars, and the animals were randomly divided to receive the following substances: 1) Negative control group (CTR): Phosphate-buffered saline (PBS), 2) Positive control group (LPS): 5 μg of *E. coli* LPS (Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* 0127:B8), 3) Experimental PAM2 group (PAM2): 5 μg of Pam2CSK4 [‡] (synthetic diacylated lipoprotein – TLR2/TLR6 ligand). All injections were performed every other day for 24 days.

At the end of the experimental period, the animals were euthanized and the maxillae were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 hours and stored in 70% ethanol to perform the following analyses.

Micro-computed tomography scanning (μ CT scanning)

Bone samples were carefully harvested to evaluate bone destruction after periodontal disease induction. Previously, maxillae were washed in distilled water, and were wrapped in humid paper to prevent artefacts as a consequence of dehydration during the scanning process. A high-resolution micro-CT imaging system^l was used with the following parameters: 18 μ m isotropic space resolution, x-ray generator at 57kVp, beam current at 184 μ A, and 0.5mm aluminium filter. For sample reconstruction, the subsequent parameters were employed using an appropriate software[¶]: defect-pixel masking: 10%, beam hardening: 20%, smoothing: 1, and individually calculated misalignment compensation values. The images were imported in specific software[#] to generate multiplanar reconstructed images and coronal datasets were saved for further volumetric analysis. Bone volume fraction (BV/TV) analysis was assessed using appropriate software^{**}, as previously described.^{20; 21} Briefly, a region of interested (ROI) with a cone frustum shape was manually delimited and 70 consecutive coronal slices were measured with a ROI extending from the root apices to the alveolar bone crest (ABC), and from the mesial root of the first molar to the distal root of the third molar including the trabecular bone of the maxillae alveolar ridge, and excluding periodontal ligament and teeth roots. Scans were de-identified and periodontal bone loss was measured by a blinded and experienced examiner (FACM).

Stereometric Analysis

After scanning, the same samples were decalcified in EDTA (0.5 M, pH 8.0) for 4 weeks at RT, and paraffin embedded. Semi-serial sections of 5 μ m were obtained on the buccal-palatal plane (transversal) and stained with hematoxylin and eosin. Images were captured using a digital camera⁺⁺ coupled to an optical microscope⁺⁺ set at 200x magnification. A 17,765 μ m²

grid with 9 x 4 squares of 30 μm (in scale with the 40x magnification used in all images) was constructed using an image editing software⁸⁶ and overlaid on the digital images as described elsewhere.²² The ROI was delimited by the whole grid, which was positioned on the connective tissue associated with the supra-crestal area at the palatal bone. A blinded and calibrated examiner (GJPLO) performed the stereometric analysis using a point-counting technique in a two-dimensional plane of the grid to get the proportion of matching tissue components with the points of intersection. The following structures observed on each intersection point of the grid were recorded: fibroblasts (elongated morphology), extracellular matrix, vascular structures, and inflammatory cells (rounded morphology). The presence of each structure was expressed as a percentage of the total area analysed as previously described.²²

TRAP staining

To examine the osteoclastic bone resorption activity, sections were stained using a TRAP staining kit.¹¹ Sections were deparaffinised and rehydrated, fixed in a fixative solution for 30 seconds, and then incubated at 37°C in TRAP staining solution (containing diazotized fast garnet, naphthol AS-BI phosphate, acetate, and tartrate solution) for 60 minutes, as described.²³ After counterstaining with Harrys hematoxylin, sections were dehydrated and cover slipped. The total number of TRAP-positive multinucleated cells containing 2 or more nuclei was counted in the palatal and buccal side of the maxilla in a total area of 245,877 μm^2 . Analysis was performed in a total of 7 mice per group by a blinded and experienced examiner (RSM).

Statistics

Analyses were performed using GraphPad Prism Software.^{¶¶} Group measures were expressed as mean $\pm$ the standard error of the mean (SEM). The Shapiro-Wilk test confirmed the normal distribution of all data ($p > 0.05$). Statistical significance was assessed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Tukey's test for multiple comparisons among groups. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Pam2-induced gingival inflammation decreases alveolar bone mass

To evaluate the general effects of the LPS and PAM2 injections in the palatal aspect of maxilla, BV/TV of the alveolar ridge were measured. The analysis of micro-CT revealed the maintenance of alveolar bone architecture in the CTR group (Figs. 1A and 1D). Alveolar bone resorption was seen for the LPS and PAM2 injection groups, which was statistically higher compared to the CTR group (Figs. 1B, 1C and 1D). LPS group was characterized by a more severe alveolar bone resorption when compared to the PAM2 group (Fig. 1D).

Pam2 induces gingival inflammation and breakdown of extracellular matrix

Histologic stereometric analysis of the maxillae was performed to assess effects by Pam2 on the cellular and extracellular matrix composition (Figs. 2A-C1 and Figs. D-G). Pam2-treatment resulted in increased proportion of inflammatory cells in PAM2 ($39.62 \pm 2.45\%$) compared to vehicle treated controls ($11.14 \pm 8.98\%$). The treatment also enhanced the proportion of vascular structures ($14.47 \pm 5.46\%$) compared to the vehicle treated controls ($10.66 \pm 2.93\%$). The inflammatory response was associated with decreased amount of gingival fibroblasts ($5.71 \pm 3.26\%$) (Figs. 2A-C1 and Figs. D-E) compared to controls ($24.38 \pm 4.30\%$) and decreased

amount of extracellular matrix ($41.52 \pm 5.37\%$) compared to controls ($56.24 \pm 4.66\%$). Similar observations were made in mice treated with LPS.

Pam2 stimulates osteoclast formation

To investigate if the decrease in bone mass induced by Pam2 was due to increased bone resorption the effect of PAM2 on osteoclast numbers was performed using TRAP staining of histological sections (Figs. 3A1-C3 and 3D). Pam2-treatment resulted in a significant increase in the number of TRAP +, multinucleated cells attached to the bone surface with extended bone contact surface compared to the vehicle-treated control group (Fig. 3D). As expected, LPS-treatment was also associated with increased number of TRAP+, multinucleated osteoclasts.

DISCUSSION

Several bacterial components and cellular pathways are involved in the pathogenesis of periodontitis; thus we don't have a complete animal model that embraces all aspects of the disease in humans. Different methods have been used to induce periodontitis in rodents including gavage, bacterial infection, ligature and LPS injections.^{1, 11, 14, 22} The selection of a specific model depends on the aspects of the disease that will be focused.¹⁰ Each of these models can mimic some components of the pathological process during the course of periodontal disease and by selecting the appropriate model for testing a specific hypothesis; each of these components can be investigated individually.¹⁰ In the study of complex aspects involved in the pathogenesis of periodontitis, the animal models offer a wide-open field of exploration, allowing better understanding about the interaction between different bacterial components and the host's periodontal tissues.^{3, 11, 12}

The localized injection of bacteria or pathogen component straight to the palatal gingival tissue is a widely used model to study periodontal disease.^{24, 25} This method results in a significant periodontal inflammation leading to the expression of a large number of inflammatory mediators that results in bone loss nearby the area of the injection.^{26, 27} Furthermore, the injection of synthetic components allows controlling the stimulus intensity, the vehicle selection and substances volume, independent of variables such as colonization and survival of exogenous bacteria. The origin of the bacterial component used is the main variable to be considered since different PAMPs active different TLRs. Among them, TLR4 recognizes lipid A in LPS, whereas TLR2 recognizes several microbial components, including lipoteichoic acid, peptidoglycans, and lipoproteins.⁶ TLRs activation triggers the production of inflammatory cytokines through activation of several signalling pathways including MAPK and NF- κ B leading to inflammatory response and bone resorption.²⁷⁻³¹

The characterization of lipoproteins as potent inducers of bone resorption³² and the identification of these molecules as constituents of periodontopathogenic bacteria^{16, 19, 32}, led us to investigate the capacity of Pam2 to induce periodontal disease. Here, we demonstrate that Pam2 is as potent as LPS to induce inflammation and periodontal bone loss in mice.

Our data is in agreement with previous studies reporting the ability of periodontopathogenic bacteria to induce alveolar bone loss activating TLR2^{15, 33} Interestingly, TLR2^{-/-} are more effective in bacterial clearance and protected from periodontal bone loss induced by *P. gingivalis*.³³ Further evidencing the importance of TLR2 for periodontal disease, TLR2 deficient mice are protected from alveolar bone destruction caused by *Tannarella forsythia*³⁴. Although the previous data demonstrate clearly the importance of TLR2 in the pathogenesis of periodontal bone loss, to the best of our knowledge, the direct stimulation of periodontal disease using lipoprotein was not previously reported.

In the present study we used a TLR4 agonist (*E. coli* LPS) as positive control. The literature shows that both receptors TLR2 and TLR4, are expressed by bone cells and once activated by their ligands, namely lipoproteins and LPS, possess the ability of stimulating bone loss during the course of inflammatory processes.^{5, 28-31} We found that both molecules could promote well-located inflammatory bone loss that was evidenced by micro-CT and histological analyses. Compared with the negative control group, both LPS and PAM2 groups demonstrate similar potential for periodontal disease induction. These findings corroborate with previous findings demonstrating osteoclast differentiation leading to severe bone loss in vivo when Pam2 was injected in mice^{28, 32}.

In our study, the observation of intense inflammation, and alveolar bone loss in the periodontal tissue of animals stimulated with *E. coli* LPS and PAM2 shows the potential involvement of both TLR2 and TLR4 in the inflammation induction and the progression of periodontitis. As expected, these features were not evidenced in the CTR group, which was characterized by the absence of tissue inflammation and bone resorption. Furthermore, the number of TRAP+ cells observed in PAM2 group suggests the participation of TLR2 in in vivo osteoclastogenesis, which might explain the increased bone resorption in the animals receiving PAM2 injections. The similar radiographic and histological disease appearance between LPS and PAM2 close resemble features of human periodontitis, validating such approach as capturing essential features of disease pathophysiology that ultimately lead to periodontal destruction.³⁵⁻³⁷

CONCLUSIONS

Our findings indicate that continued injections of PAM2 into the palatal mucosa were an effective and reproducible model to induce gingival inflammation and alveolar bone loss in

mice. This model will provide a new tool to investigate, in a more specific manner, the role of TLR2 during the course of periodontal disease once these mechanisms are not completely understood.

ACKNOWLEDGMENT

Grant support was provided by grant #080/2012 awarded by Science Without Borders to P.P.C.S and São Paulo Research Foundation (FAPESP) #2014/05283-3.

CONFLICT OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest related to this study.

FOOTNOTES

* Cristália, Itapira, São Paulo, Brazil.

† Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA.

‡ InvivoGen, San Diego, CA, USA.

§ Hamilton Company, Reno, NV, USA.

|| μCT Skyscan 1176; Skyscan, Kontich, Belgium.

¶ NRecon, v.1.6.1.5, Skyscan, Kontich, Belgium.

Data Viewer, v.1.4.3.1, Skyscan, Kontich, Belgium.

** CT-Analyser software v1.10.1.0; Skyscan, Kontich, Belgium.

†† Leica DFC 300, Leica - Reichert Diastar Products & Jung, Wetzlar, Germany.

‡‡ Leica DMLS, Leica - Reichert Diastar Products & Jung, Wetzlar, Germany.

§§ Adobe Photoshop CS6, Adobe System Incorporated, San Jose, CA, USA.

|| Leukocyte Acid Phosphatase 387-A, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.

¶¶ Graph-Pad Prism Software, Inc, La Jolla, CA, USA.

REFERENCES

1. de Molon RS, Mascarenhas VI, de Avila ED, et al. Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice. *Clin Oral Investig* 2016;20:1203-1216.
2. Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev* 2008;29:403-440.
3. Van Dyke TE, Sheilesh D. Risk factors for periodontitis. *J Int Acad Periodontol* 2005;7:3-7.
4. Holden JA, Attard TJ, Laughton KM, Mansell A, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide weakly activates M1 and M2 polarized mouse macrophages but induces inflammatory cytokines. *Infect Immun* 2014;82:4190-4203.
5. Nakamura H, Fukusaki Y, Yoshimura A, et al. Lack of Toll-like receptor 4 decreases lipopolysaccharide-induced bone resorption in C3H/HeJ mice in vivo. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:190-195.
6. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11:373-384.
7. Lin J, Bi L, Yu X, et al. Porphyromonas gingivalis exacerbates ligature-induced, RANKL-dependent alveolar bone resorption via differential regulation of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4. *Infect Immun* 2014;82:4127-4134.
8. Maekawa T, Krauss JL, Abe T, et al. Porphyromonas gingivalis manipulates complement and TLR signaling to uncouple bacterial clearance from inflammation and promote dysbiosis. *Cell Host Microbe* 2014;15:768-778.

9. Palm E, Demirel I, Bengtsson T, Khalaf H. The role of toll-like and protease-activated receptors in the expression of cytokines by gingival fibroblasts stimulated with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Cytokine* 2015;76:424-432.
10. Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa C, Jr. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Front Oral Biol* 2012;15:117-132.
11. de Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, et al. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *J Periodontol* 2014;85:465-477.
12. Polak D, Wilensky A, Shapira L, et al. Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/*Fusobacterium nucleatum* infection: bone loss and host response. *J Clin Periodontol* 2009;36:406-410.
13. 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.
14. de Molon RS, de Avila ED, Cirelli JA. Host responses induced by different animal models of periodontal disease: a literature review. *J Investig Clin Dent* 2013;4:211-218.
15. Richard PD, Thu-Thao TP, Kayde L, et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infection and immunity* 2004;72:5041-5051.
16. Jain S, Coats SR, Chang AM, Darveau RP. A novel class of lipoprotein lipase-sensitive molecules mediates Toll-like receptor 2 activation by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 2013;81:1277-1286.
17. Struillou X, Boutigny H, Soueidan A. Experimental animal models in periodontology: a review. *The open dentistry* 2010; Apr 29;4:37-47.

18. Hashimoto M, Tawaratsumida K, Kariya H, et al. Not Lipoteichoic Acid but Lipoproteins Appear to Be the Dominant Immunobiologically Active Compounds in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Immunology* 2006;177:3162-3169.
19. Kassem A, Henning P, Lundberg P, Souza PP, Lindholm C, Lerner UH. *Porphyromonas gingivalis* Stimulates Bone Resorption by Enhancing RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) through Activation of Toll-like Receptor 2 in Osteoblasts. *The Journal of biological chemistry* 2015;290:20147-20158.
20. de Molon RS, Hsu C, Bezouglaia O, et al. Rheumatoid Arthritis Exacerbates the Severity of Osteonecrosis of the Jaws (ONJ) in Mice. A Randomized, Prospective, Controlled Animal Study. *J Bone Miner Res* 2016;31:1596-1607.
21. de Molon RS, Shimamoto H, Bezouglaia O, et al. OPG-Fc but Not Zoledronic Acid Discontinuation Reverses Osteonecrosis of the Jaws (ONJ) in Mice. *J Bone Miner Res* 2015;30:1627-1640.
22. de Souza JA, Nogueira AV, de Souza PP, Cirelli JA, Garlet GP, Rossa C, Jr. Expression of suppressor of cytokine signaling 1 and 3 in ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol* 2011;56:1120-1128.
23. de Molon RS, Cheong S, Bezouglaia O, et al. Spontaneous osteonecrosis of the jaws in the maxilla of mice on antiresorptive treatment: a novel ONJ mouse model. *Bone* 2014;68:11-19.
24. Chaves de Souza JA, Frasnelli SC, Curylofo-Zotti FA, et al. NOD1 in the modulation of host-microbe interactions and inflammatory bone resorption in the periodontal disease model. *Immunology* 2016.

25. Souza JA, Medeiros MC, Rocha FR, et al. Role of NOD2 and RIP2 in host-microbe interactions with Gram-negative bacteria: insights from the periodontal disease model. *Innate Immun* 2016;22(8):598-611.
26. Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:12-20.
27. Sartori R, Li F, Kirkwood KL. MAP kinase phosphatase-1 protects against inflammatory bone loss. *J Dent Res* 2009;88:1125-1130.
28. Chaves de Souza JA, Nogueira AV, Chaves de Souza PP, et al. SOCS3 expression correlates with severity of inflammation, expression of proinflammatory cytokines, and activation of STAT3 and p38 MAPK in LPS-induced inflammation in vivo. *Mediators Inflamm* 2013;2013:650812.
29. Kassem A, Henning P, Lundberg P, Souza PP, Lindholm C, Lerner UH. *Porphyromonas gingivalis* Stimulates Bone Resorption by Enhancing RANKL (Receptor Activator of NF-kappaB Ligand) through Activation of Toll-like Receptor 2 in Osteoblasts. *J Biol Chem* 2015;290:20147-20158.
30. Matsumoto C, Oda T, Yokoyama S, et al. Toll-like receptor 2 heterodimers, TLR2/6 and TLR2/1 induce prostaglandin E production by osteoblasts, osteoclast formation and inflammatory periodontitis. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;428:110-115.
31. Zhang P, Liu J, Xu Q, et al. TLR2-dependent modulation of osteoclastogenesis by *Porphyromonas gingivalis* through differential induction of NFATc1 and NF-kappaB. *J Biol Chem* 2011;286:24159-24169.

32. Kim J, Yang J, Park OJ, et al. Lipoproteins are an important bacterial component responsible for bone destruction through the induction of osteoclast differentiation and activation. *J Bone Miner Res* 2013;28:2381-2391.
33. Elia B, Gilad B, Lior S, Gabriel N. Cutting Edge: TLR2 Is Required for the Innate Response to *Porphyromonas gingivalis*: Activation Leads to Bacterial Persistence and TLR2 Deficiency Attenuates Induced Alveolar Bone Resorption. *The Journal of Immunology* 2006;177:8296-8300.
34. Myneni SR, Settem RP, Connell TD, Keegan AD, Gaffen SL, Sharma A. TLR2 signaling and Th2 responses drive *Tannerella forsythia*-induced periodontal bone loss. *J Immunol* 2011;187:501-509.
35. Souza PC, Lerner UH. The role of cytokines in inflammatory bone loss. *Immunol Invest* 2013;0300;42.
36. Bruce LP, Bryan SM, Newell WJ. Periodontal diseases. *Lancet (London, England)* 2005;366:1809-1820.
37. Chan P, Zachary RA, Mario T, et al. Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. *Journal of periodontology* 2007;78:273-281.

FIGURE LEGENDS

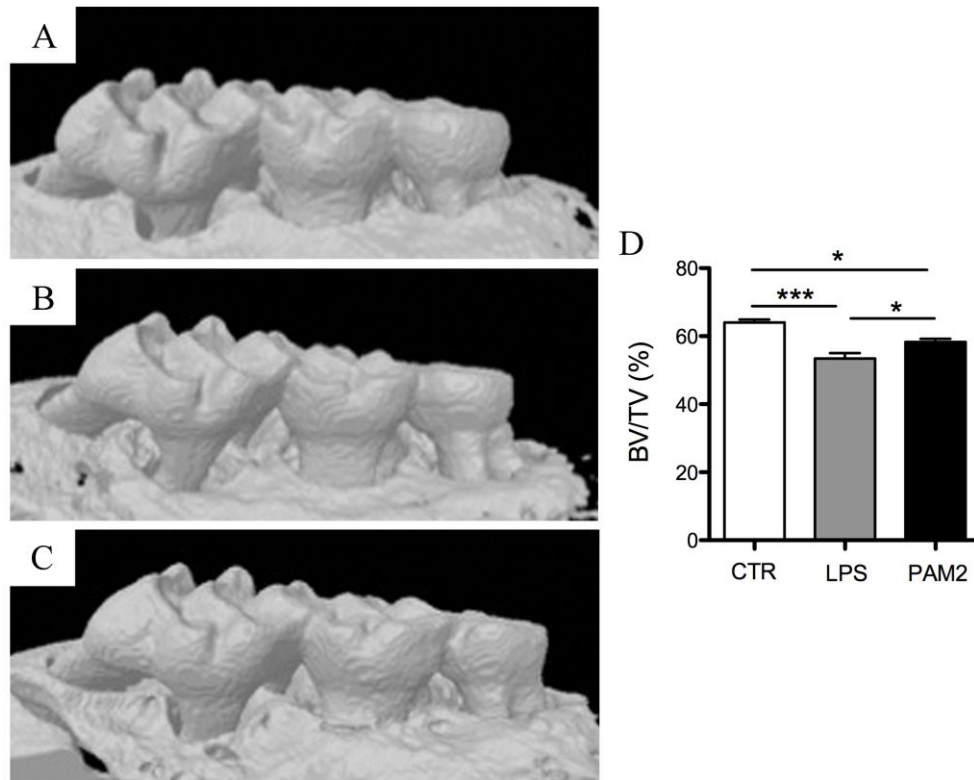


Figure 1. Microtomographic analysis of alveolar bone. **(A-C)** CTR group injected with saline solution, LPS group injected with 5 μ g LPS and, PAM2 group injected with 5 μ g PAM2 every other day, for 24 days, in the gingival papilla in the palatal aspect between the first and second molars, respectively. **(D)** Quantification of BV/TV in the maxilla of all mice. *Statistically significant different from indicated group $p < 0.05$; ***Statistically significant different from indicated group $p < 0.0001$. Differences among groups were calculated by one-way ANOVA followed by Tukey's test. Data represent the mean $\pm$ SEM.

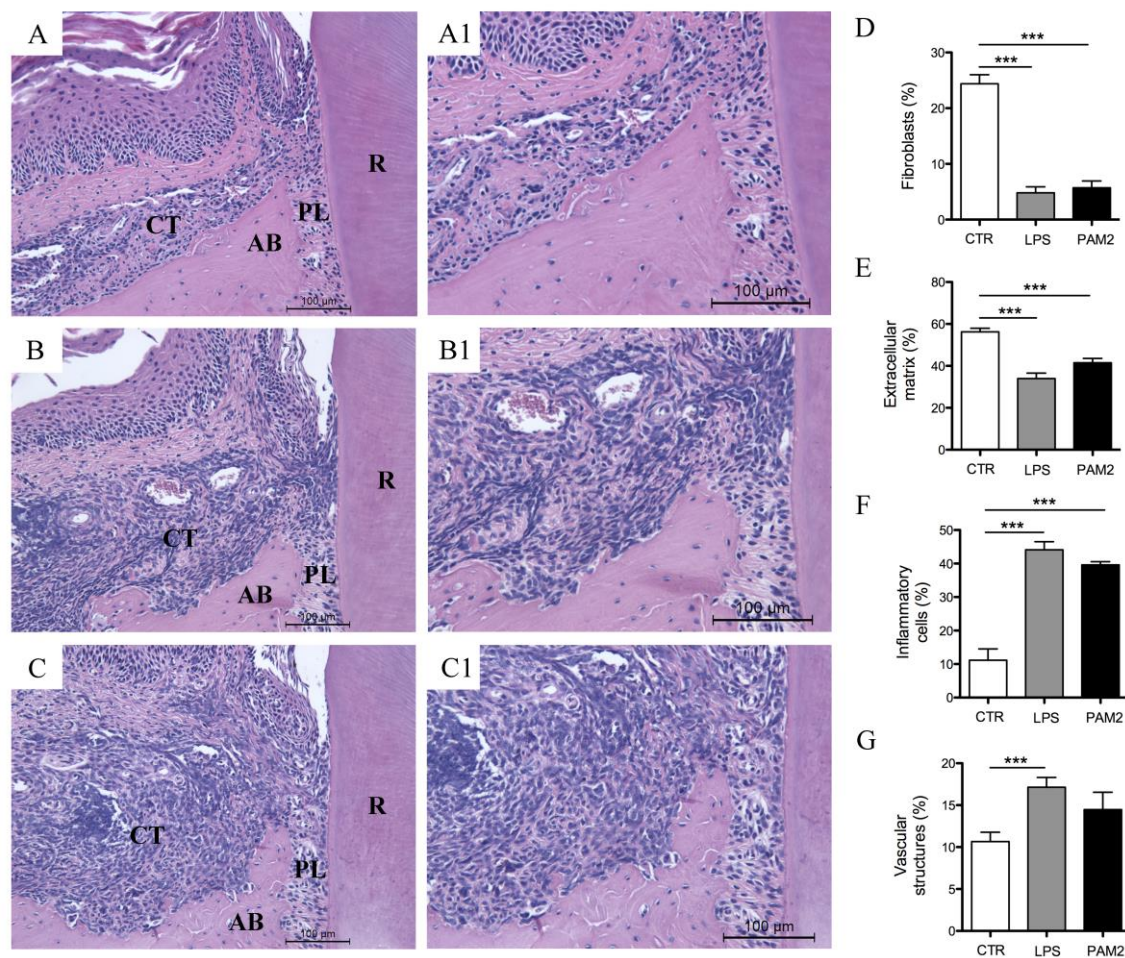


Figure 2. Representative H&E-stained images from maxilla and quantification of the stereometric findings. **(A-C)** CTR, LPS and PAM2 groups, respectively. Original magnification, x200. **(A1-C1)** CTR, LPS and PAM2 groups, respectively. Original magnification, x400. **(D-G)** Quantification of relative presence of fibroblasts, extracellular matrix, inflammatory cells, and vascular structures. AB - alveolar bone; CT - connective tissue; PL - periodontal ligament; R - root. *Statistically significant different from indicated group $p < 0.05$; ***Statistically significant different from indicated group $p < 0.0001$. Differences among groups were calculated by one-way ANOVA followed by Tukey's test. Data represent the mean $\pm$ SEM.

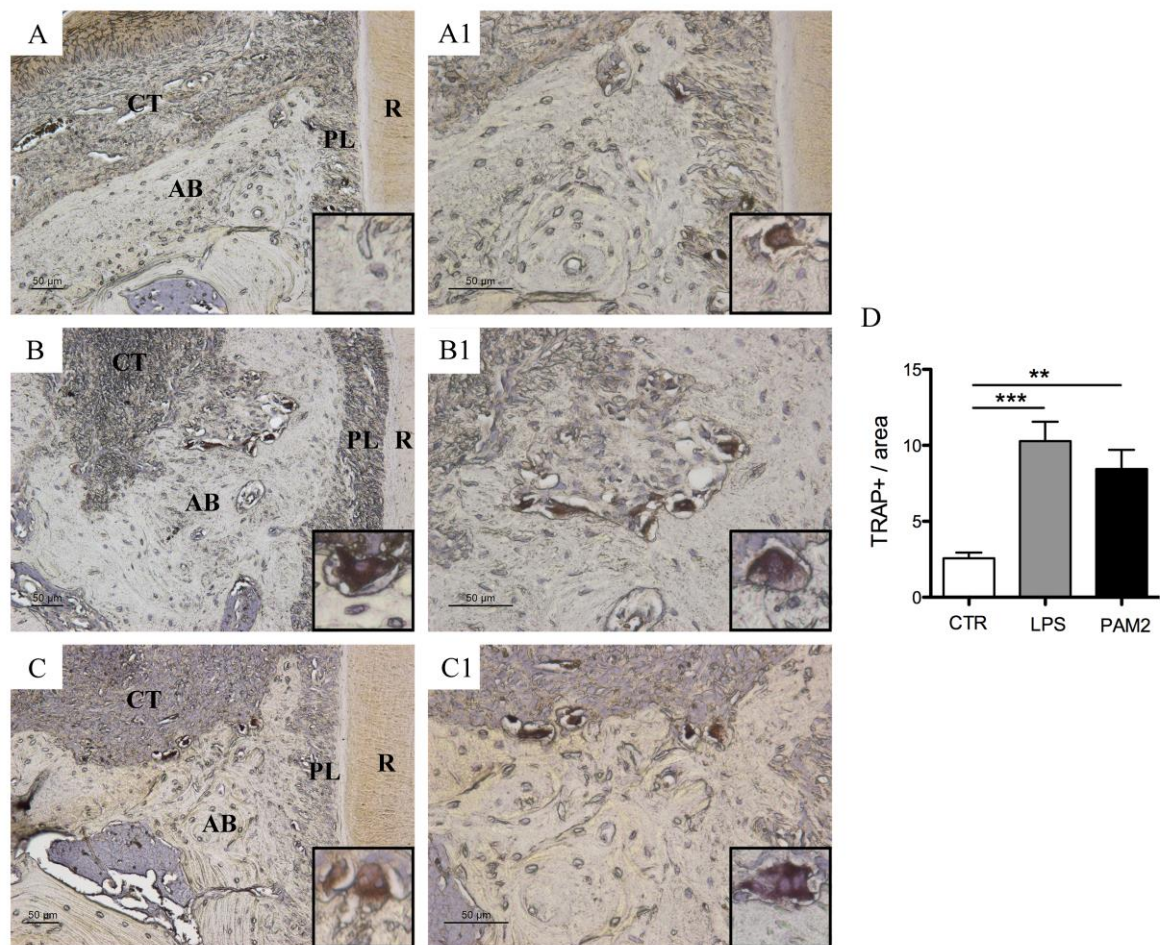


Figure 3. Counting of TRAP+ multinucleated cells. **(A-C)** Control, LPS and PAM groups respectively. Original magnification, x20. **(A1-C1)** Magnified views of in the control, LPS and PAM groups. Original magnification, x40. Insets are magnified views of individual TRAP+ cells in all groups. **(D)** Quantification of TRAP+ cell number in all mice and groups ($n = 7$ mice per group). AB - alveolar bone; CT - connective tissue; PL - periodontal ligament; R - root. ** Statistically significant different from indicated groups, $p < 0.001$. *** Statistically significant different from indicated groups, $p < 0.0001$. Differences among groups were calculated by one-way ANOVA followed by Tukey's test. Data represent the mean $\pm$ SEM.

3.2 Publicação 2*

Interleucina-4 (IL-4) apresenta efeito osteoprotetor na periodontite induzida por lipoproteínas

Autores Magalhaes, FAC; Coletto-Nunes, G; Lima-Teixeira, JF; Floriano-Marcelino, T., Oliveira, GJPL; Souza, PPC

Resumo

A periodontite é uma doença óssea inflamatória, fruto da interação entre o biofilme bacteriano e o sistema imune do hospedeiro. A ativação do sistema imune na periodontite envolve o reconhecimento de componentes bacterianos como as lipoproteínas, que são capazes de ativar os receptores tipo Toll-2 (TLR2), recentemente associados à perda óssea. A citocina interleucina-4 (IL-4) apresenta papel protetor ósseo, inibindo a produção de RANKL e a osteoclastogênese induzida por diversos fatores. A ação da IL-4 na osteoclastogênese induzida por lipoproteína ainda não foi investigada. Para tanto, foi utilizado um modelo de indução de periodontite por lipoproteína sintética (PAM2), para avaliação dos efeitos da IL-4 in vivo. Os efeitos in vitro foram abordados em macrófagos de medula óssea de camundongos (MMO) diferenciados em osteoclastos e em osteoblastos isolados da calvária de camundongos neonatos. Os estudos in vivo demonstraram que a IL-4 apresenta efeito osteoprotetor, reduzindo a perda óssea linear em análise microtomográfica. A análise histológica demonstrou a capacidade da IL-4 inibir os efeitos deletérios induzidos por PAM2 no tecido periodontal. A IL-4 foi capaz de inibir a osteoclastogênese induzida por PAM2, demonstrado por coloração TRAP e contagem do número de osteoclastos. Além disso, IL-4 inibiu o aumento da expressão de marcas fenotípicas de osteoclastos induzida por PAM2. Na cultura de osteoblastos, a análise por RT qPCR mostrou que IL-4 foi capaz de inibir a expressão de RANKL induzida por PAM2, além de aumentar a expressão de OPG. A IL-4 apresentou ação osteoprotetora no modelo de indução de doença periodontal por lipoproteína sintética, tendo sido observado que sua ação se deu por mecanismos de ação diretos e indiretos resultando na regulação negativa da osteoclastogênese. Os mecanismos intracelulares e vias de sinalização envolvidos permanecem carentes de investigação.

Palavras chave: periodontite, inflamação, reabsorção óssea

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

Abstract

Periodontitis is an inflammatory disease, seen as result of bacterial biofilm and the host immune system interaction. The activation of the immune system in periodontitis involves the recognition of bacterial components such as lipoproteins that can activate toll-like receptor 2 (TLR2), recently associated with bone loss. The cytokine interleukin-4 (IL-4) has a protective role in inflammatory bone resorption, inhibiting the production of RANKL and the osteoclastogenesis induced by several factors. The action of IL-4 on lipoprotein-induced osteoclastogenesis has not been investigated yet. A model of periodontitis induction with a synthetic lipoprotein (PAM2), treated or not with IL-4, was used to evaluate the effects in vivo. In vitro effects were accessed in mouse bone marrow macrophages (BMMs) and in osteoblasts from neonatal calvarial bones. In vivo studies have shown that IL-4 has an osteoprotective effect, reducing linear bone loss in microtomographic analysis. Histological analysis has shown the ability of IL-4 to restore to the control levels, the number of fibroblasts, extracellular matrix, and inflammatory cells in the group treated with the association of PAM2 and IL-4. The culture of BMCs stimulated by PAM2 and treated with IL-4, compared to the PAM2 group, reduced the number of TRAP+ cells at the control level. The expression of the phenotypic marks of the osteoclast Rank, Ctsk, Nfat2 and TRAP, observed in the RT qPCR induced by Pam2 was partially inhibited by IL-4. In osteoblasts, RT qPCR analysis revealed that IL-4 could inhibit RANKL and stimulate OPG expression in the IL-4 and PAM2 treated groups. In this study, IL-4 presented an osteoprotective action in the PAM2-induced periodontal disease model, and it occurs through direct and indirect mechanisms, resulting in a downregulation of osteoclastogenesis.

Keywords: periodontitis, inflammation, bone resorption

INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença de alta prevalência que pode levar à perda óssea alveolar decorrente da interação entre o biofilme subgengival e o sistema imune do hospedeiro^{1, 2}. O sistema imune pode ser ativado por componentes moleculares, presentes nas bactérias, com a capacidade de estimular a produção e a liberação de mediadores inflamatórios por diferentes grupos celulares, interagindo, inclusive, com as células do tecido ósseo¹.

O sistema imune reconhece e responde a padrões moleculares associados a patógenos (PMAPs) através de receptores específicos para esta finalidade, conhecidos como receptores tipo *Toll* (TLR)³. A ativação dos TLRs é responsável pelo desencadeamento de eventos que visam a proteção contra os microrganismos, mas que podem comprometer os tecidos do hospedeiro^{4, 5, 6, 7}. Estudos recentes demonstraram que as lipoproteínas são um grupo de PMAPs com a capacidade de ativar osteoclastos e estimular a destruição óssea através da ligação específica ao receptor tipo *Toll* 2 (TLR2)^{8, 9}. Este dado é significativo para a patogênese da periodontite, uma vez que as lipoproteínas compõem um fator de virulência de destaque, associados a *Porphyromonas gingivalis* (Pg.)¹⁰, reconhecidamente um dos principais agentes etiológicos da doença periodontal^{11, 12}.

As lipoproteínas podem levar à destruição do tecido ósseo através de mecanismos que envolvem a interação direta com osteoclastos, promovendo sua diferenciação e ativação através dos TLR2 presentes na superfície celular, capazes de desencadear a via de sinalização dependente de uma proteína adaptadora, a Myd88, envolvida na ativação da via do fator nuclear kappa B (NFκB), responsável pela osteoclastogênese¹³. De maneira indireta, a ativação do TLR2 em outros grupos celulares, leva ao aumento da expressão de citocinas pro-inflamatórias como TNF-α, IL-6 e IL-1, que compõem um eixo de promoção da osteoclastogênese independente do eixo RANK-RANKL-OPG^{1, 14}. Quando interagem com os TLR2 presentes na superfície de osteoblastos, as lipoproteínas também atuam de forma indireta na osteoclastogênese, induzindo a produção de RANKL e diminuindo a expressão de OPG, importante agente regulador da osteoclastogênese induzida por RANKL⁸.

A patogênese da doença periodontal, decorrente da instalação do processo inflamatório via estímulo bacteriano, envolve, dentre outros mediadores, a atuação de citocinas pro e anti-inflamatórias^{1, 2, 15}. As citocinas pro-inflamatórias são geralmente associadas a um fenótipo osteolítico pois apresentam a propriedade de estimular a

osteoclastogênese^{16, 17} e citocinas com perfil anti-inflamatório, como a IL-4 e a IL-13, apresentam fenótipo osteoprotetor¹⁸. Em especial, a IL-4 vem sendo descrita com a capacidade de inibir a osteoclastogênese por mecanismos que envolvem a ação direta sobre os osteoclastos e, indireta sobre os osteoblastos e células componentes do processo inflamatório^{18, 19, 20, 21}.

Os mecanismos de interação da IL-4 com o tecido ósseo podem envolver a inibição da síntese de prostaglandinas, o aumento da expressão de OPG e a inibição da expressão de RANKL por osteoblastos^{18, 22}, ou a ação sobre células residentes como os fibroblastos gengivais, inibindo a expressão de citocinas da família da IL-6 e dos receptores de cininas^{23, 24}. Alguns mecanismos diretos da IL-4 envolvem a inibição da via NFκB e a ativação da PPARγ1 ambas associadas à osteoclastogênese²⁰. Independente dos mecanismos descritos, o papel da IL-4 na osteoclastogênese estimulada por componentes bacterianos, como lipoproteínas, no processo fisiopatológico do desenvolvimento da periodontite, permanece carente de investigação.

Os mecanismos conhecidos, descritos como efeitos da IL-4, nos conduzem à hipótese de que a IL-4 seja capaz de interferir na diferenciação de osteoclastos e consequentemente, na reabsorção óssea induzida por lipoproteínas no periodonto de camundongos. Neste estudo nós avaliamos a ação da IL-4 in vivo e in vitro, analisando os efeitos diretos e indiretos da IL-4 sobre a osteoclastogênese induzida por uma lipoproteína sintética, a Pam₂CSK₄.

MATERIAL E MÉTODO

Cuidado com os animais

Foram utilizados 21 camundongos machos (*Mus musculus*, *rodentia*, *muridae*, *swiss mice*) com 4-5 semanas de idade e 3 camundongos recém-nascidos com 48-72 horas de vida. Os procedimentos experimentais foram conduzidos seguindo os preceitos estabelecidos pelo Comitê de ética para cuidado animal local (Anexo A, Processo - CEUA 11/2015). Os camundongos foram mantidos nas instalações do biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista de Araraquara - SP (FOAr UNESP), em ambiente climatizado com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas com oferta de água e ração *ad libitum*.

Indução da doença periodontal com PAM2

Os animais foram divididos em 3 grupos: controle, controle positivo (PAM2) e grupo estudo (IL-4/Pam2). Os camundongos receberam injeções bilaterais na área localizada entre os primeiros e segundos molares superiores, em dias alternados, por um período de 15 dias. O grupo controle foi tratado com sessões de duas injeções de 3 μL do veículo (PBS + BSA 0,1%); O grupo PAM2 recebeu uma dose de 3 μL do veículo e uma dose de Pam₂CSK₄ (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) após um intervalo de 30 minutos, por sessão; o grupo IL-4/PAM2 recebeu uma dose de IL-4 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e uma dose de Pam₂CSK₄ com intervalo de 30 minutos. Após o período experimental de 15 dias, os animais foram eutanasiados, as maxilas extraídas, fixadas e preparadas para análise por microtomografia computadorizada e posteriormente preparadas para análise histológica.

Microrotomografia computadorizada

Após a eutanásia, as maxilas extraídas foram fixadas e estocadas em álcool 70%. Em seguida, foram escaneadas usando um sistema de imagem por microtomografia computadorizada (μCT Skyscan 1176; Skyscan®, Kontich, Belgium). As imagens foram obtidas com espaço isotrópico de resolução de 18 μm , 57 kVp e 184 μA com o uso de filtro de alumínio de 0,5mm. A análise linear se deu pela obtenção das medias mensuradas das distancias da crista alveolar à junção amelo-cementária, em quatro regiões pré-determinadas: faces mesial

e distal dos primeiros e segundos molares maxilares de cada espécime, as medidas foram obtidas com um software destinado a esse propósito (CT-Analyzer software v1.10.1.0; Skyscan®, Kontich, Belgium). As médias das mensurações obtidas foram levadas a efeito após a análise estatística pertinente.

Análise histológica

A análise estereométrica do processo inflamatório foi realizada com um microscópio óptico Leica DMLS (Leica - Reichert Diastar Products & Jung, Wetzlar, Germany) (200X). As áreas de interesse dos cortes pré-selecionados foram fotografadas com câmera digital Leica DFC 300 FX (Leica - Reichert Diastar Products & Jung, Wetzlar, Germany). 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: matriz extracelular, fibroblastos, células inflamatórias e vasos sanguíneos. A quantificação foi executada com o auxílio de grade composta por 9 x 4 quadros, confeccionada com 17,765 μm^2 . Esta, por sua vez, foi sobreposta na região do tecido conjuntivo imediatamente superior ao osso palatino entre o primeiro e segundo molar superior, com auxílio do software Adobe Photoshop CS4. Para cada corte, foram contados 50 pontos da grade que coincidiram sobre as estruturas histológicas. Em seguida, foi executada uma análise percentual de cada componente tecidual em relação ao número total de pontos contados.

Análise imunohistoquímica para TRAP

Os cortes histológicos montados em lâminas silanizadas foram submetidos a inativação da peroxidase endógena pela aplicação de peróxido de hidrogênio 3% por 10 minutos. Os epítomos inespecíficos foram bloqueados com protein Block (Abcam – USA) por 10 minutos. Sequencialmente, os cortes foram incubados por 16 horas nos anticorpos primários para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) (1:200) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA). Em seguida, os cortes foram tratados pelo método do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) e corados por DAB. Por fim, receberam contra-coloração com hematoxilina de Carrazi para evidência dos núcleos celulares. O número total de células TRAP positivas multinucleadas (≥ 3) foram contadas nos lados vestibular e palatino na região localizada entre os primeiros e segundos molares em uma área de 245,877 μm^2 .

Cultura de osteoblastos

Células ósseas foram isoladas dos ossos parietais de camundongos com 3-4 dias de vida através da técnica da digestão por colagenase²⁵. As células obtidas foram semeadas com densidade de 2×10^4 células/poço, em placa para cultura de células com 96 poços. Após 24h, foram divididas em grupo controle (PBS 1X), PAM2 (50ng/mL), IL4 (50ng/mL) e Pam2 + IL4(50ng/mL) e receberam estes tratamentos por 48 horas. Ao término do período experimental, as células foram lisadas e o RNA extraído seguindo as especificações do fabricante (RNAqueus microKit - Thermo Fisher Scientific) para a realização dos estudos por RT qPCR.

Cultura de macrófagos de medula óssea

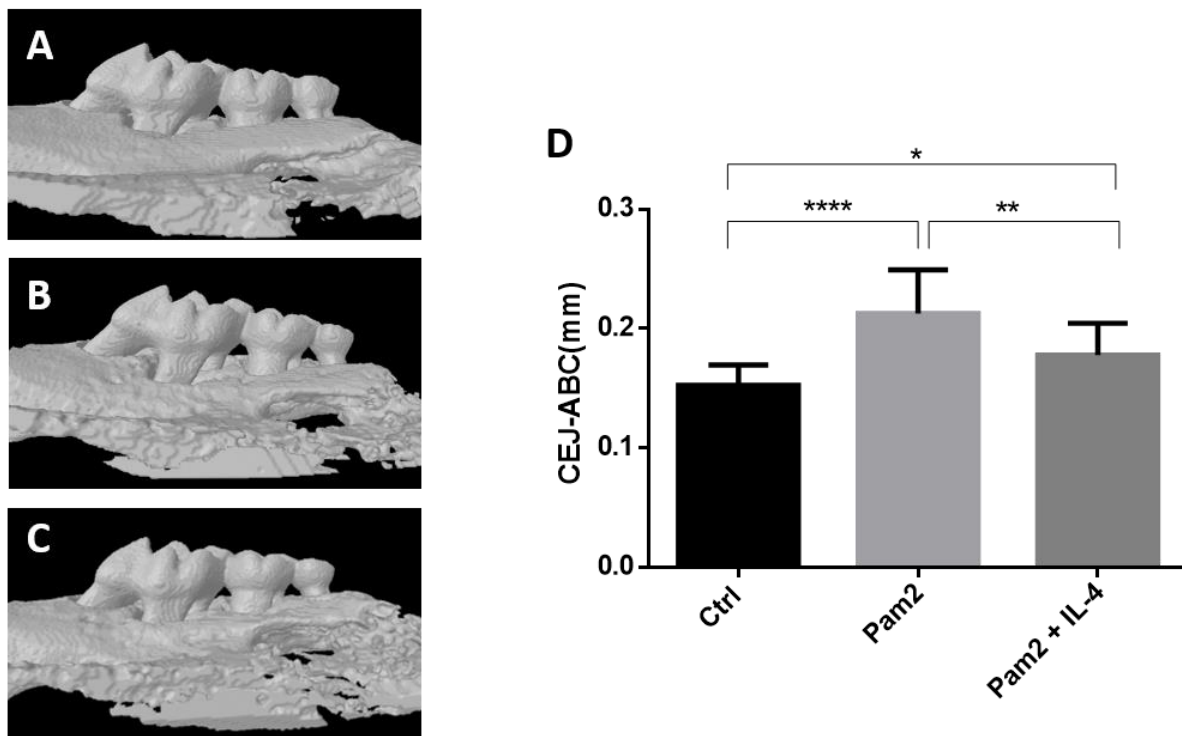
Os macrófagos de medula óssea (MMO) foram obtidos a partir da técnica de lavagem da medula das tíbias e fêmures de camundongos com 5 semanas de idade ²⁶. As células de medula óssea foram incubadas com 30 ng/mL de MCSF por 3 dias. Os macrófagos aderidos foram semeados com densidade de 5×10^3 células/poço, em placa de cultura de células com 96 poços, e primadas com MCSF (30ng/mL) e RANKL (4ng/mL) por 24 horas. Decorrido este período, foram divididas nos seguintes grupos: Controle tratado apenas com MCSF (4ng/mL); grupo PAM2, após 24 horas no meio contendo MCSF + RANKL (4ng/mL), recebeu 200 ng/mL of Pam₂CSK₄ com MCSF por 72 horas adicionais; grupo Pam₂+IL4, após 24 horas no meio contendo MCSF + RANKL, recebeu meio de cultura contendo Pam₂CSK₄ (200ng/mL), IL4 (50ng/mL) e MCSF (30 ng/mL) por 72 horas adicionais. Ao fim do período experimental, os poços foram fixados com paraformoldeído 4% tamponado, e corados para TRAP (Sigma Aldrich). As células multinucleadas TRAP+ (TRAP+ MuOCLs) foram contadas e os dados foram submetidos a análise estatística. Os mesmos grupos foram replicados e destinados à extração de RNA para análise de expressão gênica por RT-qPCR.

Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk para estudo da distribuição dos resultados. Após a constatação da distribuição normal, para os estudos, foi expressa a média com desvio padrão com evidenciação das diferenças estatisticamente significativas frente à realização do one-way ANOVA, complementado por pós-teste de Tukey considerando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Figura 1 - IL-4 apresenta propriedade protetora contra a perda óssea alveolar induzida por PAM2



Reconstrução em 3 dimensões das imagens obtidas por microtomografia computadorizada com espécimes representativos do grupo controle (Ctrl, n=16 – Figura 1A), PAM2 (n=14, Figura 1B) e Pam2+IL4 (n=16, Figura 1C). Gráfico da média da análise das áreas padronizadas para mensuração linear da distância entre a crista alveolar e a junção amelo-cementária das regiões mesial e distal dos primeiros e segundos molares superiores (one-way ANOVA, com complementação do pós-teste de Tukey, $p \leq 0.05$).

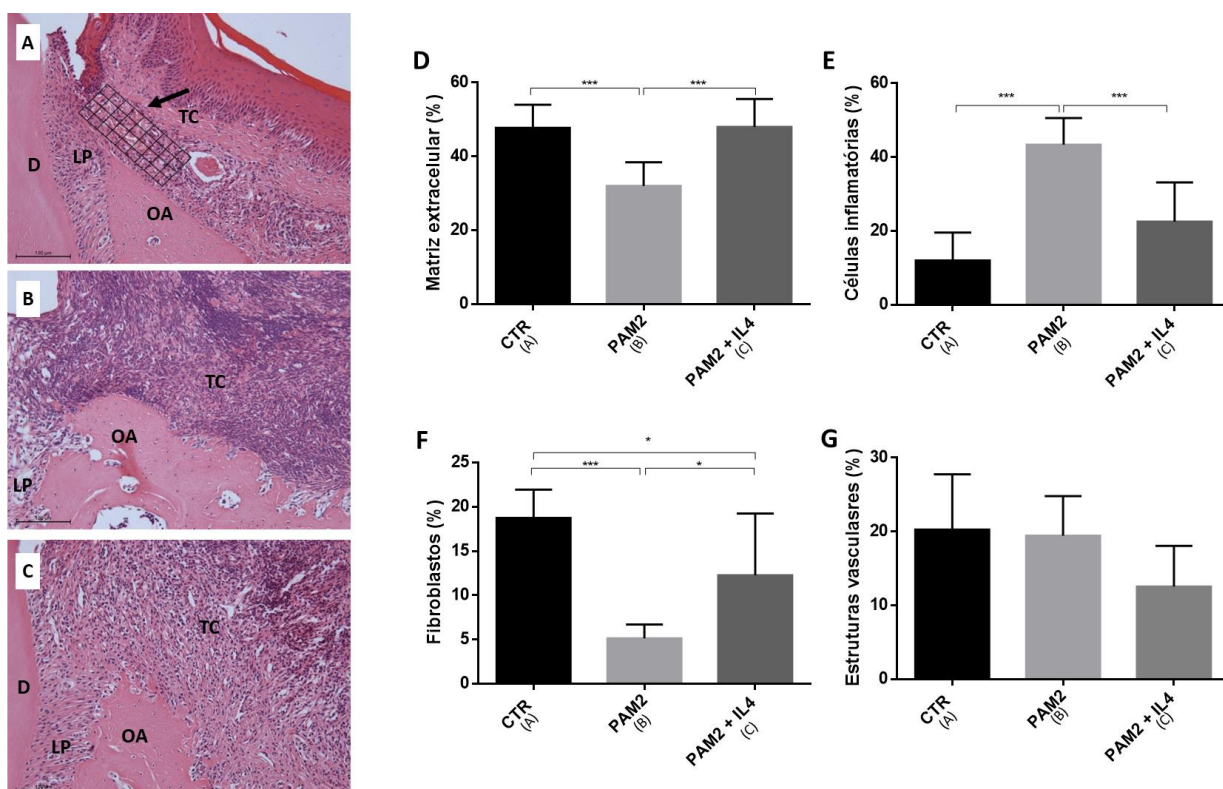
Fonte: Elaboração própria

Para avaliar o papel desempenhado pela IL-4 na reabsorção óssea induzida por Pam₂CSK₄, foi seguido o protocolo de indução de doença periodontal induzida por lipoproteína desenvolvida anteriormente por nosso grupo*. O grupo controle, que recebeu apenas injeções do veículo, em avaliação microtomográfica das medias das medidas lineares das regiões mesial e distal dos primeiros e segundos molares, não apresentou perda óssea alveolar durante o período experimental, com os espécimes apresentando o padrão representado pela reconstrução 3D (Figura 1A). O grupo tratado com injeções sequenciais do veículo e de PAM2, foi o que apresentou maior perda óssea nas regiões mensuradas (Figura

*MAGALHÃES FAC, SOUZA J, OLIVEIRA G, MOLON R, SOUZA P. Lipoproteins induce periodontal destruction in mice. Material a ser publicado pelo Journal of Periodontology, Boston, EUA 2018.

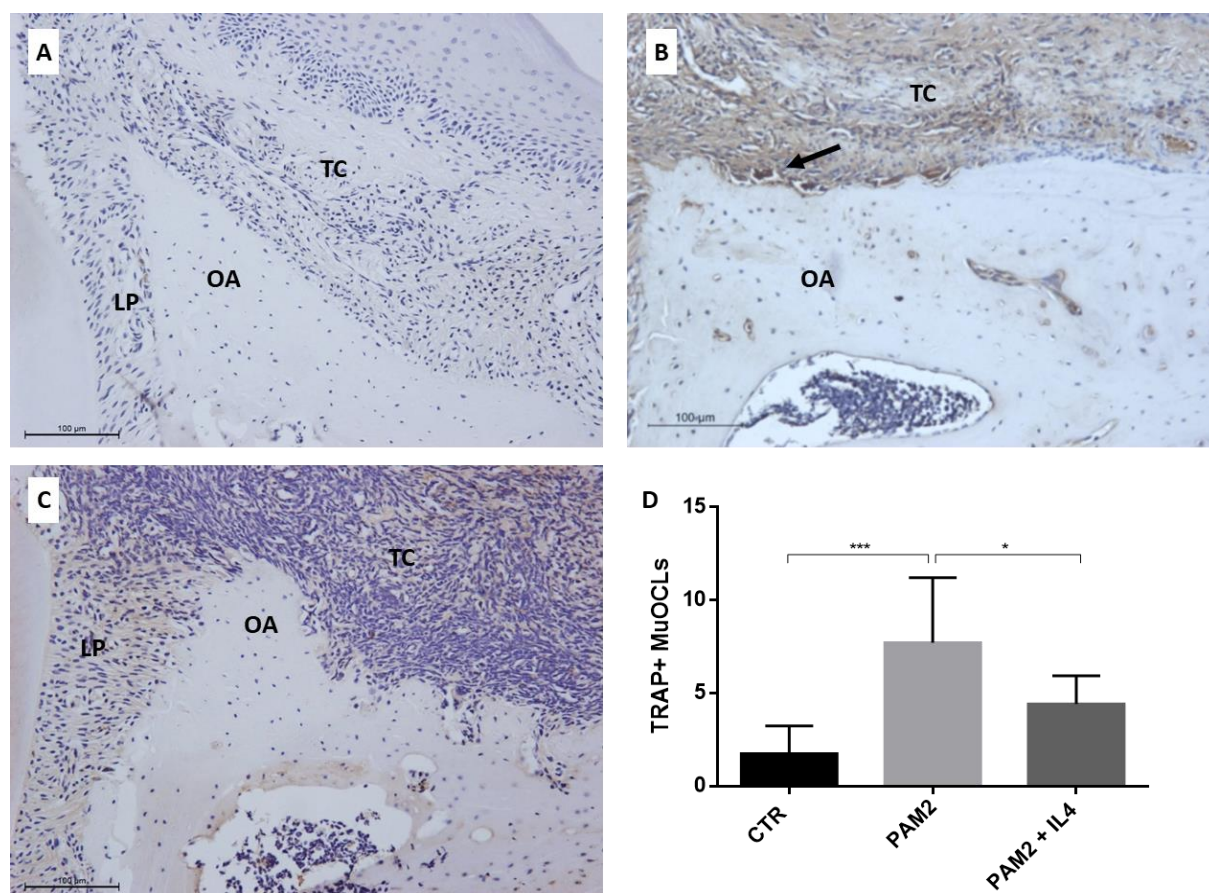
1B e 1D), enquanto o grupo tratado com IL-4 30 minutos antes da injeção de PAM2 (Figura 1C), embora tenha apresentado perda óssea alveolar quando comparado com o grupo controle, quando comparada com o grupo PAM2 (Figura 1B), apresentou menor nível de reabsorção óssea alveolar, com diferença estatisticamente significativa (Figura 1D).

Figura 2 – Resultados da Estereometria



Imagens representativas dos grupos tratados com veículo (Figura 2A – CTR), PAM2 (Figura 2B) e PAM2+IL4 (Figura 2C). Gráficos representativos da análise estereométrica relativo à quantificação de Matriz extracelular (Figura 2D), Células inflamatórias (Figura 2E), Fibroblastos (Figura 2F) e Estruturas vasculares (Figura 2G). Na figura 2A vê-se (seta) a representação da grade sobreposicionada para a contagem das estruturas (one-way ANOVA complementado pelo teste de Tukey, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). D=dente; LP=ligamento periodontal; OA=osso alveolar e TC=tecido conjuntivo.

Fonte: Elaboração própria

Figura 3 – Resultado da marcação de TRAP por imunohistoquímica

Imagens representativas da coloração imunohistoquímica para TRAP dos grupos tratados com veículo (A-CTR), PAM2 (B) e PAM2+IL4 (C). A seta indica osteoclastos TRAP+. Gráficos representativos da contagem do número de células TRAP+ (TRAP+MuOCLs) nos grupos experimentais (one-way ANOVA complementado pelo teste de Tukey, * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$). LP=ligamento periodontal; OA=osso alveolar e TC=tecido conjuntivo.

Fonte: Elaboração própria.

“IL4 reduz os componentes do processo inflamatório e o número de células TRAP+”

A aplicação de PAM2 aumentou a presença de células inflamatórias (Figura 2B) e de células TRAP+ (Figura 3B) e reduziu a quantidade de componentes do tecido conjuntivo saudável (matriz e fibroblastos) quando comparado ao grupo controle (Figura 2A). IL4 foi capaz de reduzir os efeitos inflamatórios induzidos por PAM2 (Figura 2C), tendo sido observada também, a redução de células inflamatórias e de células TRAP+ (Figura 3C) e aumento da quantidade de fibroblastos e matriz do tecido conjuntivo. Porém a inibição não foi total em relação ao número de fibroblastos, uma vez que foi observado que o grupo CTR apresentou maior número desse grupo celular, comparado ao grupo PAM2 + IL4.

“IL-4 inibe a formação de células TRAP+ em cultura de MMO estimulada por PAM2”

Frente aos dados observados no estudo in vivo, considerando o papel desempenhado pelos osteoclastos na perda óssea alveolar, analisamos o papel da IL-4 diretamente em células precursoras de osteoclastos (MMO) frente ao estímulo de PAM2. O grupo controle não apresentou a formação de células multinucleadas TRAP+ (Figura 4A) diferente no observado no grupo estimulado com PAM2 (Figura 4B). O grupo estimulado por PAM2 e tratado com IL-4 (Figura 4C) apresentou resultados aos níveis do grupo controle, comprovando a ação protetora da IL-4 frente a osteoclastogênese estimulada por lipoproteína (PAM2).

Figura 4 – Cultura de macrófagos de medula óssea tratados com IL4

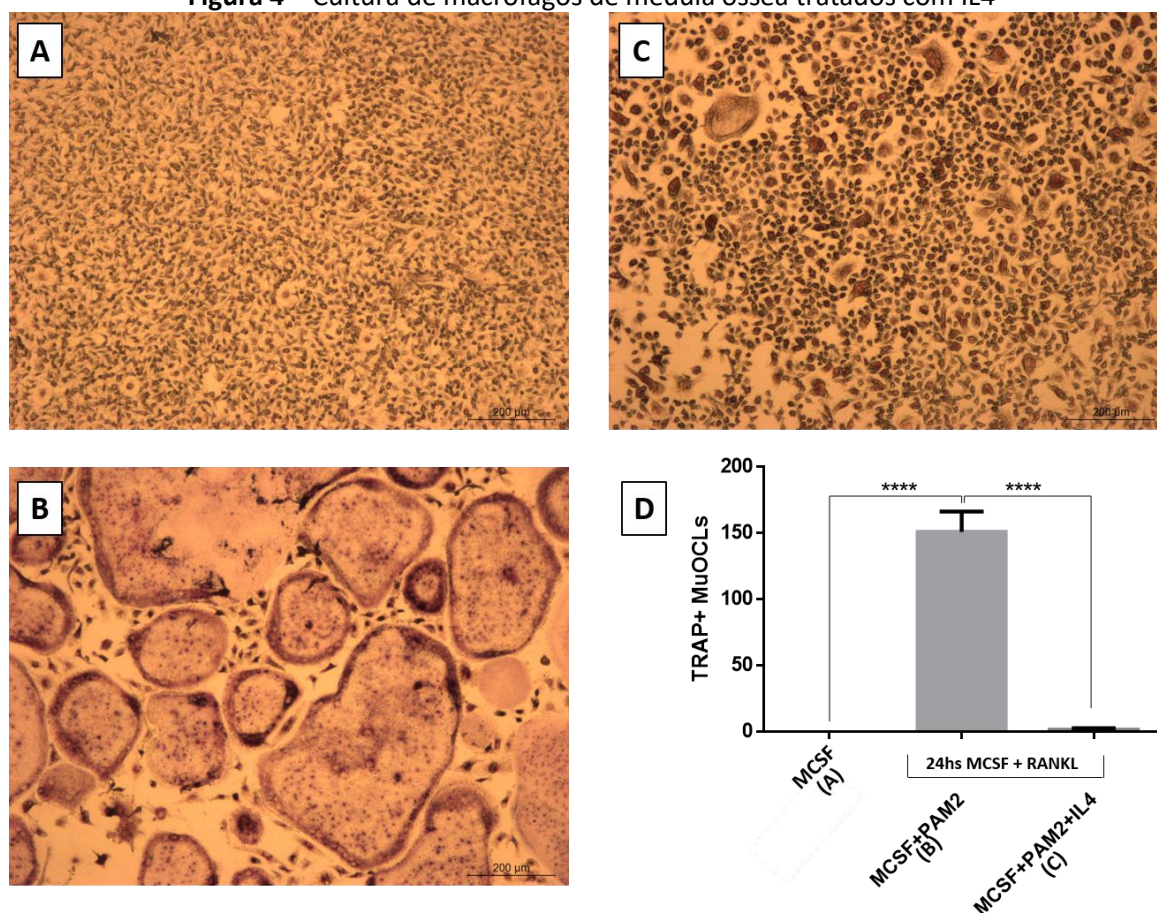


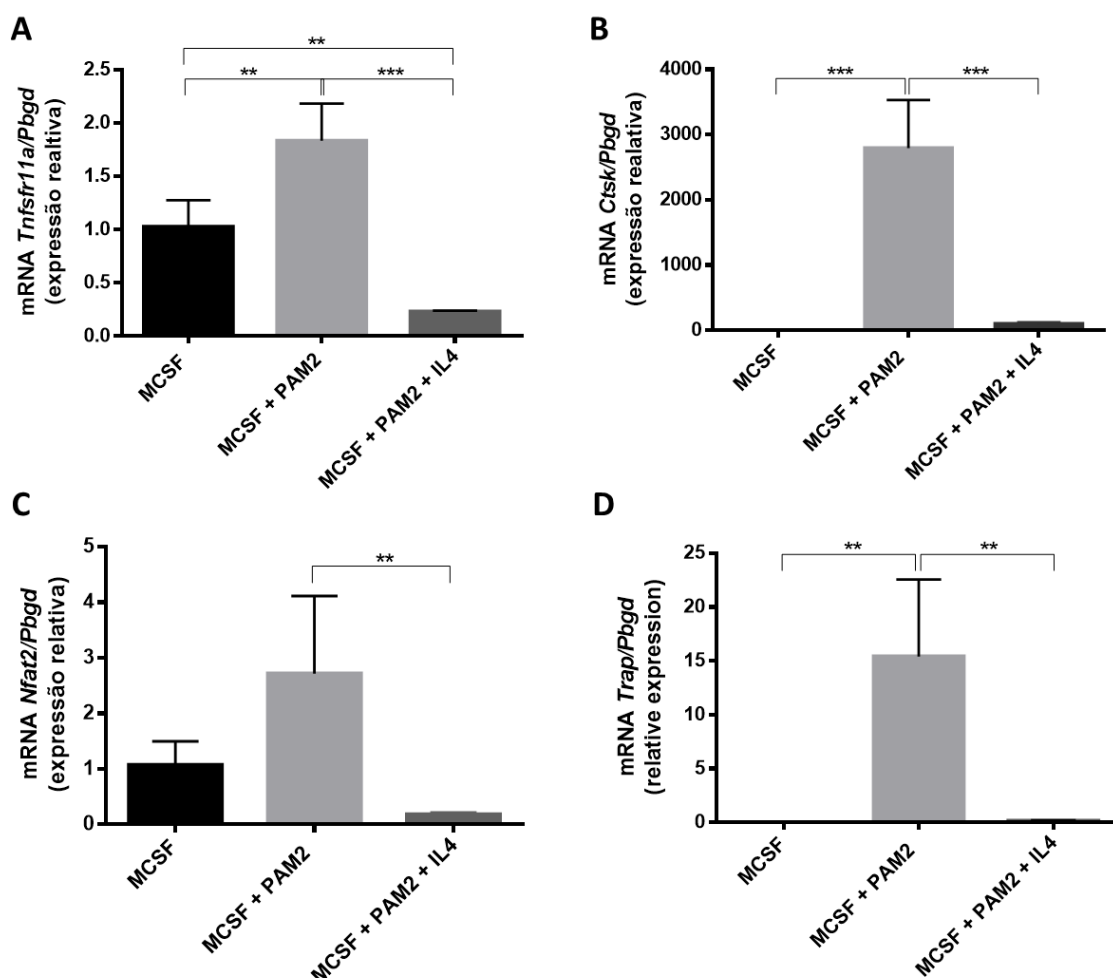
Imagem da cultura de macrófagos de medula óssea (MMO) tratados de acordo com a divisão dos grupos. Grupo controle tratado com MCSF por 24 horas com troca do meio, também com MCSF por 72 horas adicionais (n=4, A); o Grupo MCSF+PAM2 foi tratado com MCSF+RANKL por 24 horas e, com a troca do meio de cultura, foi adicionado MCSF+PAM2 por 72 horas adicionais (n=4, B) e o grupo MCSF+PAM2+IL4, após 24 horas de MCSF+RANKL, foi tratado por 72 horas adicionais pelas substâncias que representam o grupo (n=4, MCSF+PAM2+IL4 – C). Gráfico da contagem do número de células multinucleadas TRAP+ presente nos grupos experimentais (D) (one-way ANOVA complementado pelo teste de Tukey, ***p<0.0001).

Fonte: Elaboração própria.

“IL4 reduz a expressão de marcas fenotípicas de osteoclastos em MMOs estimulados por PAM2”

Diante da capacidade de IL-4 em inibir a formação de células multinucleadas TRAP+ em MMOs estimulados por Pam2, neste estudo, os grupos foram reproduzidos para que as células lisadas fossem estudadas por RT qPCR visando a análise da expressão das marcas fenotípicas associadas a osteoclastos. Para tanto, foram analisadas as expressões do mRNA de RANK – *Tnfrsf11* (Figura 5A), *Ctsk* (Figura 5B), *Nfat2* (Figura 5C) e *Trap* (Figura 5D). O tratamento das MMOs com IL-4 mostrou a capacidade de inibir a expressão das marcas fenotípicas selecionadas, ao nível da expressão do grupo controle IL4 (Figuras 5A-D).

Figura 5 – Resultado do estudo por RT qPCR da expressão das marcas fenotípicas de osteoclastos



Gráficos do estudo da expressão do mRNA por RT qPCR das marcas fenotípicas de osteoclastos *Rank* (A), *Ctsk* (B), *Nfat2*(C) e *Trap* (D).

Fonte: Elaboração própria.

“IL-4 inibe a expressão do mRNA de RANKL e estimula a expressão de OPG em cultura de osteoblastos tratadas com PAM2”

Uma vez observada a ação direta da IL-4 sobre a osteoclastogênese, neste estudo avaliamos a possibilidade de uma interferência indireta da IL-4 sobre a osteoclastogênese a partir da interação com osteoblastos. Para isso, cultura primária de osteoblastos de camundongos foram estimuladas por PAM2 e tratadas com IL-4 por 24 e 48 horas. Nas primeiras 24 horas, foi observado um aumento na expressão do mRNA de RANKL no grupo tratado com PAM2, efeito que foi bloqueado por IL-4 (Figura 4A). O mesmo padrão de expressão de RANKL foi mantido para o período de 48h (Figura 4B). Já a expressão do mRNA de OPG, apresentou seu pico de expressão nas 48 horas analisadas neste estudo (Figura 4D).

Figura 6 – Resultado da expressão de RANKL e OPG em 24 e 48 horas

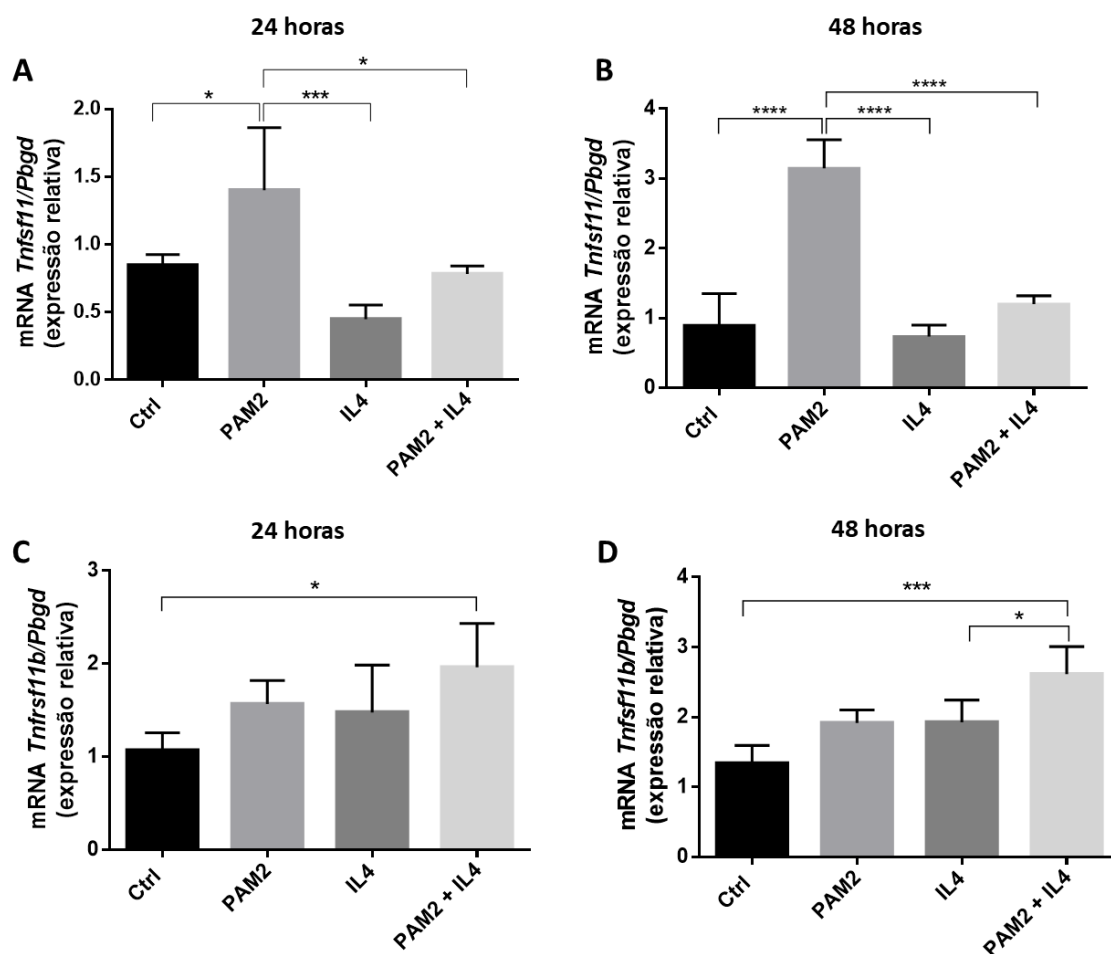


Gráfico da expressão de RANKL (A,B) e OPG (C,D) em cultura primária de osteoblastos, respectivamente com 24 e 48 horas de tratamento com veículo, PAM2, IL4 e PAM2+IL4. (n=4, one-way ANOVA complementado pelo teste de Tukey, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001).

Fonte: Elaboração própria.

DISCUSSÃO

A IL-4 possui ação pleiotrópica e é secretada por linfócitos Th2 ativados, basófilos, eosinófilos e mastócitos²⁷. Todas as respostas biológicas relacionadas a ação da IL-4, são dependentes da interação com dois tipos de receptores²². Os receptores tipo 1 são reconhecidos por sua expressão em células derivadas de precursores hematopoiéticos. São formados por um heterodímero composto de uma subunidade α (IL-4R α) e uma cadeia γ comum (γ c) que se liga de maneira específica a IL-4^{1, 22, 23, 28, 29}. Já o receptor tipo 2, presente em derivados de precursores mesenquimais e também em macrófagos de medula óssea, é composto por uma subunidade IL-4R α e uma unidade IL13R α , o que permite a ligação com a IL-13 e a IL-4, explicando os efeitos biológicos compartilhados por essas citocina^{22, 23}. Por serem oriundas de células que expressam receptores de IL-4, tanto osteoblastos quanto osteoclastos respondem aos estímulos desta citocina¹.

Em processos inflamatórios crônicos é observada a presença da IL-4, que pode ser detectada, inclusive, no fluido crevicular gengival³⁰. Estudos preliminares associaram a ausência ou níveis reduzidos da IL-4 no fluido crevicular, com aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento da doença periodontal^{31, 32}. Polimorfismos da IL-4 são associados não só com a suscetibilidade como também com a agressividade da doença periodontal, dado evidenciado em diferentes grupos populacionais, creditando à IL-4 um papel de destaque no processo fisiopatológico da evolução da periodontite^{33, 34, 35, 36, 37}. Sendo assim, a IL-4 secretada por fibroblastos gengivais, desempenharia um papel modulador da osteoclastogênese decorrente de processos inflamatórios^{23, 36}. Corroborando com o papel modulador do processo inflamatório, em nosso estudo, a IL-4 apresentou efeito osteoprotetor significativo, representado pela redução da perda óssea alveolar nos animais com indução da reabsorção óssea induzida por PAM2, tratados com IL-4, comparados aos animais que não receberam o tratamento. Nossas análises apontam que o papel modulador da reabsorção óssea da IL-4, se estende ao um modelo experimental de periodontite induzida por lipoproteína em camundongos *.

O papel da IL-4 frente à perda óssea alveolar in vivo, foi abordada em estudos anteriores, que fizeram de diferentes modelos de indução em camundongos deficientes para

*MAGALHÃES FAC, SOUZA J, OLIVEIRA G, MOLON R, SOUZA P. Lipoproteins induce periodontal destruction in mice. Material a ser publicado pelo Journal of Periodontology, Boston, EUA 2018.

IL-4^{38, 39}. Em 2000 Sasaki *et al.* propuseram um modelo de reabsorção óssea periapical que mostrou que IL-10, e não IL-4, desempenharia o papel osteoprotetor⁴⁰. Estudo recente de Araujo-Pires *et al.*³⁸, usando um modelo de indução de reabsorção óssea por gavagem utilizando colônias de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, demonstraram que além do papel osteoprotetor, o papel anti-inflamatório da IL-4 seria creditado também a uma ação quimiotática frente a linfócitos T reguladores (Treg) que agiriam em sinergia com os linfócitos Th2 na modulação do processo. Os resultados divergentes frente ao papel da IL-4 na reabsorção alveolar apresentados nos motivaram a considerar o uso de um modelo, onde a ação da IL-4 pudesse ser avaliada a partir de uma fonte exógena dessa citocina, inoculada diretamente no sítio de indução do processo inflamatório, no caso do nosso modelo, a IL-4 recombinante foi inoculada 30 minutos antes a indução com lipoproteína*. Até o presente momento, nosso estudo é o primeiro a evidenciar papel osteoprotetor da IL-4 na doença periodontal induzida por PAM2.

A PAM2 (Pam₂CSK₄) utilizada nesse estudo, é uma lipoproteína sintética recentemente descrita com a capacidade de estimular a reabsorção óssea via a ativação do TLR2^{8, 40}. Kim *et al* em 2013, associou o efeito de PAM2 sobre os osteoclastos, com o aumento da atividade de NFκB, AP-1 e NFAT nos precursores de osteoclastos, num processo que envolve, ao menos em parte, TNFα e IL-6 que tiveram seus níveis aumentados na medula de animais que receberam injeção peritoneal de PAM2. Em 2015, Kassem *et al*, demonstrou que animais deficientes para TLR2 (TLR2^{-/-}) estavam protegidos contra a reabsorção óssea induzida por PAM2 em calota de camundongos e, in vitro, a PAM2 foi capaz de aumentar a expressão de RANKL pelos osteoblastos, evidenciando uma ação indireta sobre o processo de osteoclastogênese⁹. O modelo utilizado em nossos estudos mostrou que PAM2 foi capaz de induzir a perda óssea alveolar in vivo, e este fenômeno se mostrou consideravelmente amenizado frente a administração da IL-4.

Estudos pioneiros associaram a ação da IL-4 com a capacidade de inibir a osteoclastogênese in vitro em MMOs³⁰, dando início a estudos que buscaram a elucidação dos mecanismos envolvidos nos processos in vivo e in vitro^{18, 21, 22, 23, 38, 41, 42}. Hoje é sabido que a IL-4 pode atuar diretamente sobre os precursores de osteoclastos e essa inibição é

*MAGALHÃES FAC, SOUZA J, OLIVEIRA G, MOLON R, SOUZA P. Lipoproteins induce periodontal destruction in mice. Material a ser publicado pelo Journal of Periodontology, Boston, EUA 2018.

dependente de STAT6^{21, 22}; pode inibir a expressão dos receptores de cininas em osteoblastos e fibroblasto gengival, levando a diminuição de PGE2, IL1 β , TNF α e RANKL ⁴⁵ entre outros mecanismos. Nossos experimentos in vitro corroboram com os achados anteriores, mostrando que a IL-4 mantém a propriedade osteoprotetora frente ao estímulo de PAM2, inibindo a osteoclastogênese por ação direta sobre os precursores de osteoclastos e, indiretamente, inibindo a produção de RANKL. Mesmo tendo sido demonstrado que a IL-4 pode desempenhar um papel significativo na modulação da osteoclastogênese⁴⁴ pelos seus mecanismos conhecidos, um dado que nos chamou a atenção, foi a capacidade adicional da IL-4 estimular a produção de OPG pelos osteoblastos, atingindo o pico de produção nas 48 horas do estudo, o que contribuiria sobremaneira com o efeito deste grupo celular. Explicando, ao menos em partes, nossos achados no experimento in vivo.

Em nossa análise histológica, foi possível observar que o grupo tratado com PAM2, apresentou um aumento significativo de células inflamatórias no tecido conjuntivo adjacente a área de aplicação, reduzido de fibroblastos e matriz extracelular. É descrito que o IL-1 produzido por fibroblastos gengivais, seria responsável por modular atividade da metaloproteinase-3 (MMP3), resultando na destruição tecidual e recrutamento de células inflamatórias⁴⁶. Este mecanismo poderia explicar nossos achados histológicos, em que observamos redução de matriz extracelular na gengiva dos animais tratados com Pam2 e níveis próximos do controle nos animais tratados com IL-4 em associação com Pam2.

Nossos achados, agregados com os dados da literatura sugerem que a IL-4 possa exercer, de fato, um papel modulador do processo inflamatório e da reabsorção óssea induzida por inflamação. A diversidade de células componentes do periodonto que respondem aos estímulos da IL-4, denotam que seu papel frente ao desenvolvimento e agressividade da doença periodontal. Sendo assim, a compreensão do papel desta citocina em cada uma destas células auxiliará no desenvolvimento de novas ações terapêuticas no tratamento das periodontites e de outras doenças associadas às perdas ósseas inflamatórias.

CONCLUSÃO

A IL4 desempenhou um papel protetor na evolução da perda óssea alveolar na periodontite induzida por lipoproteína e os estudos in vitro corroboraram com os achados, mostrando que os efeitos sobre a ação dos osteoclastos se dão por ação direta, interferindo

na atividade dos osteoclastos; e indireta, reduzindo a produção de RANKL e potencializando a produção de OPG por parte dos osteoblastos.

REFERÊNCIAS

- 1 Souza PP, Lerner UH. The role of cytokines in inflammatory bone loss. *Immunol Invest.* 2013;42(7):555-622.
- 2 Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet.* 2005; 366(9499):1809-20.
- 3 Mahanonda R, Pichyangkul S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373-84.
- 4 Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373-84.
- 5 Lin J, Bi L, Yu X, Kawai T, Taubman MA, Shen B et al. Porphyromonas gingivalis exacerbates ligature-induced, RANKL-dependent alveolar bone resorption via differential regulation of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4. *Infect Immun.* 2014;82(10):4127-34.
- 6 Tomoki M, Krauss JL, Abe T, Jotwani R, Triantafilou M, Triantafilou K et al. Porphyromonas gingivalis Manipulates Complement and TLR Signaling to Uncouple Bacterial Clearance from Inflammation and Promote Dysbiosis. *Cell Host Microbe.* 2014;15(6):768-78.
- 7 Eleonor P, Demirel I, Bengtsson T, Khalafet H . The role of toll-like and protease-activated receptors in the expression of cytokines by gingival fibroblasts stimulated with the periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis. *Cytokine.* 2015;76(2):424-32.
- 8 Kim J, Yang J, Park OJ, Kang S, Kim WS, Kurokawa K et al. Lipoproteins are an important bacterial component responsible for bone destruction through the induction of osteoclast differentiation and activation. *J Bone Miner Res.* 2013;28(11):2381-91.
- 9 Kassem A, Lindholm C, Lerner UH. Toll-Like receptor 2 stimulation of osteoblasts mediates staphylococcus aureus induced bone resorption and osteoclastogenesis through enhanced RANKL. *PLoS One.* 2016;11(6):e015670.
- 10 Asai Y, Hashimoto M, Fletcher HM, Miyake K, Akira S, Ogawa T et al. Lipopolysaccharide preparation extracted from Porphyromonas gingivalis lipoprotein-deficient mutant shows a marked decrease in toll-like receptor 2-mediated signaling. *Infect Immun.* 2005;73(4):2157-63.
- 11 Jaroslav M. Porphyromonas gingivalis: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res.* 2014;2014:476068.
- 12 Holt SC, Ebersole JL. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000.* 2005;38:72-122.

- 13 Zhang, P, Liu J, Xu Q, Harber G, Feng X, Michalek SM, KATZ J. TLR2-dependent modulation of osteoclastogenesis by *Porphyromonas gingivalis* through differential induction of NFATc1 and NF-kappaB. *J Biol Chem*. 2011;286(27):24159-69.
- 14 Takeda, K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 2004;16(1):3-9.
- 15 Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000. 1997;14:9-11.
- 16 Lerner UH. Osteoclast formation and resorption. *Matrix Biol*. 2000;19(2):107-20.
- 17 Roux S, Orcel P. Bone loss. Factors that regulate osteoclast differentiation: an update. *Arthritis Res*. 2000;2(6):451-6.
- 18 Onoe Y, Miyaura C, Kaminakayashiki T, Nagai Y, Noguchi K, Chen QR et al. IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. *J Immunol*. 1996;156(2):758-64.
- 19 Riancho JA, Zarrabeitia MT, Gonzalez-Macias J. Interleukin-4 modulates osteoclast differentiation and inhibits the formation of resorption pits in mouse osteoclast cultures. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;196(2):678-85.
- 20 Bendixen AC, Shevde NK, Dienger KM, Willson TM, Funk CD, Pike JW. IL-4 inhibits osteoclast formation through a direct action on osteoclast precursors via peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(5):2443-8.
- 21 Abu-Amer Y. IL-4 abrogates osteoclastogenesis through STAT6-dependent inhibition of NF-kappaB. *J Clin Invest*. 2001;107(11):1375-85.
- 22 Palmqvist P, Lundberg P, Persson E, Johansson A, Lundgren I, Lie A et al. Inhibition of hormone and cytokine-stimulated osteoclastogenesis and bone resorption by interleukin-4 and interleukin-13 is associated with increased osteoprotegerin and decreased RANKL and RANK in a STAT6-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2006;281(5):2414-29.
- 23 Souza PP, Palmqvist P, Lundberg P, Lundgren I, H  nstr  m L, Souza JA et al. Interleukin-4 and interleukin-13 inhibit the expression of leukemia inhibitory factor and interleukin-11 in fibroblasts. *Mol Immunol*. 2012;49(4):601-10.
- 24 Souza PP, Brechter AB, Reis RI, Costa CA, Lundberg P, Lerner UH. IL-4 and IL-13 inhibit IL-1   and TNF-   induced kinin B1 and B2 receptors through a STAT6-dependent mechanism. *Br J Pharmacol*. 2013;169(2):400-12.
- 25 Susanne G, Henning P, Lindholm C, Lerner UH. Osteoclast progenitor cells present in significant amounts in mouse calvarial osteoblast isolations and osteoclastogenesis increased by BMP-2. *Bone*. 2013;52(1): 83-92.
- 26 Takeshita S, Kaji K, Kudo A. Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. *J Bone Miner Res*. 2000;15(8):1477-88.
- 27 Watanabe K, Tanaka Y, Morimoto I, Yahata K, Zeki K, Fujihira T et al. Interleukin-4 as a potent inhibitor of bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;172(3):1035-41.
- 28 Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:701-38.

- 29 Gessner A, Rölinghoff M. Biologic functions and signaling of the interleukin-4 receptor complexes. *Immunobiology*. 2000;201(3-4):285-307.
- 30 Kabashima H, Nagata K, Hashiguchi I, Toriya Y, Iijima T, Maki K et al. Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-4 in gingival crevicular fluid of patients with inflammatory periodontal disease. *J Oral Pathol Med*. 1996;25(8):449-55.
- 31 Shapira L, Van Dyke TE, Hart TC. A localized absence of interleukin-4 triggers periodontal disease activity: a novel hypothesis. *Med Hypotheses*. 1992;39(4):319-22.
- 32 Bastos MF, Lima JA, Vieira PM, Mestnik MJ, Faveri M, Duarte PM. TNF-alpha and IL-4 levels in generalized aggressive periodontitis subjects. *Oral Dis*. 2009;15(1):82-7.
- 33 Gonzales JR, Mann M, Stelzig J, Bödeker RH, Meyle J. Single-nucleotide polymorphisms in the IL-4 and IL-13 promoter region in aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2007;34(6):473-9.
- 34 Anovazzi G, Medeiros MC, Pigossi SC, Finoti LS, Mayer MP, Rossa Junior C et al. Functional haplotypes in interleukin 4 gene associated with periodontitis. *PLoS One*. 2017;12(1):e0169870.
- 35 Anovazzi G, Finoti LS, Corbi SC, Kim YJ, Marcaccini AM, Gerlach RF et al. Interleukin 4 haplotypes of susceptibility to chronic periodontitis are associated with IL-4 protein levels but not with clinical outcomes of periodontal therapy. *Hum Immunol*. 2013;74(12):1688-95.
- 36 Anovazzi G, Kim YJ, Viana AC, Curtis KM, Orrico SR, Cirelli JA et al. Polymorphisms and haplotypes in the interleukin-4 gene are associated with chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Periodontol*. 2010;81(3):392-402.
- 37 Jain N, Joseph R, Balan S, Arun R, Banerjee M. Association of interleukin-4 and interleukin-17F polymorphisms in periodontitis in Dravidian ethnicity. *Indian J Hum Genet*. 2013;19(1):58-64.
- 38 Araujo-Pires AC, Vieira AE, Francisconi CF, Bigueti CC, Glowacki A, Yoshizawa S et al. IL-4/CCL22/CCR4 axis controls regulatory T-cell migration that suppresses inflammatory bone loss in murine experimental periodontitis. *J Bone Miner Res*. 2015;30(3):412-22.
- 39 Sasaki H, Hou L, Belani A, Wang CY, Uchiyama T, Müller R, Stashenko P. IL-10, but not IL-4, suppresses infection-stimulated bone resorption in vivo. *J Immunol*. 2000;165(7):3626-30.
- 40 Kassem A, Henning P, Lundberg P, Souza PP, Lindholm C, Lerner UH. *Porphyromonas gingivalis* Stimulates Bone Resorption by Enhancing RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) through Activation of Toll-like Receptor 2 in Osteoblasts. *J Biol Chem*. 2015;290(33):20147-58.
- 41 Shioi A, Teitelbaum SL, Ross FP, Welgus HG, Suzuki H, Ohara J. et al. Interleukin 4 inhibits murine osteoclast formation in vitro. *J Cell Biochem*. 1991;47(3):272-7.
- 42 Mangashetti LS, Khapli SM, Wani MR. IL-4 inhibits bone-resorbing activity of mature osteoclasts by affecting NF-kappa B and Ca²⁺ signaling. *J Immunol*. 2005;175(2):917-25.
- 43 Ujiie Y, Karakida T, Yamakoshi Y, Ohshima T, Gomi K, Oida S. Interleukin-4 released from human gingival fibroblasts reduces osteoclastogenesis. *Arch Oral Biol*. 2016;72(12):187-93.
- 44 Souza PP, Brechter AB, Reis RI, Costa CA, Lundberg P, Lerner UH. IL-4 and IL-13 inhibit IL-1 β and TNF- α induced kinin B1 and B2 receptors through a STAT6-dependent mechanism. *Br J Pharmacol*. 2013;169(2):400-12.

- 45 Chambers M, Kirkpatrick G, Evans M, Gorski G, Foster S, Borghaei RC. IL-4 inhibition of IL-1 induced Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) expression in human fibroblasts involves decreased AP-1 activation via negative crosstalk involving of Jun N-terminal kinase (JNK). *Exp Cell Res.* 2013;319(10):1398-408.

4 CONCLUSÕES

Podemos concluir que:

1. O modelo de reabsorção óssea periodontal induzido por lipoproteína sintética se mostrou viável, efetivo, reproduzível e se apresenta como um instrumento útil para estudos que envolvam a ativação do TLR2 na doença periodontal;
2. A IL4 desempenhou um papel protetor na evolução da perda óssea alveolar na periodontite induzida por lipoproteína e os estudos in vitro corroboraram com os achados, mostrando que os efeitos sobre a ação dos osteoclastos se dão por ação direta, interferindo na atividade dos osteoclastos; e indireta, reduzindo a produção de RANKL e potencializando a produção de OPG por parte dos osteoblastos;

REFERÊNCIAS*

- 1 Hiroshi T. Principles of bone biology. Part I: basic principles. 3rd ed. San Diego: Elsevier; 2008. p. 211-9.
- 2 Junqueira JLCC. Histologia básica. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2013.
- 3 Olney RC. Regulation of bone mass by growth hormone. *Med Pediatr Oncol*. 2003; 41(3): 228-34.
- 4 Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3 Suppl 3:S131-9.
- 5 Hannon MJ, Verbalis JG. Sodium homeostasis and bone. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014; 23(4): 370-6
- 6 Wennberg C, Hessle L, Lundberg P, Mauro S, Narisawa S, Lerner UH, et al. Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *J Bone Miner Res*. 2000; 15(10): 1879-88.
- 7 Walsh NC, Gravallesse EM. Bone remodeling in rheumatic disease: a question of balance. *Immunol Rev*. 2010; 233(1): 301-12.
- 8 Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. 2003; 423(6937): 349-55.
- 9 Yagi S, Sata M. Pre-clinical data on the role of mineralocorticoid receptor antagonists in reversing vascular inflammation. *Eur Heart J Suppl*. 2011; 13(B): B15-20
- 10 Kalajzic I, Staal A, Yang WP, Wu Y, Johnson SE, Feyen JH, et al. Expression profile of osteoblast lineage at defined stages of differentiation. *J Biol Chem*. 2005; 280(26): 24618-26.
- 11 Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, et al. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology*. 1988; 123(5): 2600-2.
- 12 Kristensen HB, Andersen TL, Marcussen N, Rolighed L, Delaisse JM. Osteoblast recruitment routes in human cancellous bone remodeling. *Am J Pathol*. 2014; 184(3): 778-89.
- 13 Bezooijen RLV, Papapoulos SE, Hamdy NAT, Löwik CWGM. Part I: basic principles - osteoblasts and osteocytes. 3rd ed. San Diego: Elsevier; 2008. p.139-52.
- 14 Atkins GJ, Findlay DM. Osteocyte regulation of bone mineral: a little give and take. *Osteoporos Int*. 2012; 23(8): 2067-79.
- 15 Xiong J, Piemontese M, Onal M, Campbell J, Goellner JJ, Dusevich V, et al. Osteocytes, not osteoblasts or lining cells, are the main Source of the RANKL required for osteoclast formation in remodeling bone. *PLoS One*. 2015; 10(9): e0138189.
- 16 Wysolmerski JJ. Osteocytic osteolysis: time for a second look? *Bonekey Rep*. 2012; 1: 229.
- 17 O'Brien CA, Nakashima T, Takayanagi H. Osteocyte control of osteoclastogenesis. *Bone*. 2013; 54(2): 258-63.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

- 18 Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, et al. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87(18): 7260-4.
- 19 Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, et al. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 1999; 397(6717): 315-23.
- 20 Roux S, Orcel P. Bone loss. Factors that regulate osteoclast differentiation: an update. *Arthritis Res*. 2000; 2(6): 451-6.
- 21 Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998; 93(2): 165-76.
- 22 Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, et al. A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function. *Bone*. 1999; 25(1): 109-13.
- 23 Yamamoto Y, Udagawa N, Matsuura S, Nakamichi Y, Horiuchi H, Hosoya A, et al. Osteoblasts provide a suitable microenvironment for the action of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. *Endocrinology*. 2006; 147(7): 3366-74.
- 24 Seeman E. Bone modeling and remodeling. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2009; 19(3): 219-33.
- 25 Yamamoto Y, Udagawa N, Matsuura S, Nakamichi Y, Horiuchi H, Hosoya A, et al. Osteoblasts provide a suitable microenvironment for the action of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. *Endocrinology*. 2006; 147(7): 3366-74.
- 26 Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008; 473(2): 139-46.
- 27 Long CL, Humphrey MB. Osteoimmunology: the expanding role of immunoreceptors in osteoclasts and bone remodeling. *Bonekey Reports*. 2012; 1: 59.
- 28 Mensah KA, Li J, Schwarz EM. The emerging field of osteoimmunology. *Immunol Res*. 2009; 45(2-3): 100-13.
- 29 Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr rev*. 2008; 29(4): 403-40.
- 30 Hiroshi T. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7(4): 292-304.
- 31 Graves DT, Li J, Cochran DL. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res*. 2011; 90(2): 143-53.
- 32 Rik L. The balance of tissue repair and remodeling in chronic arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011; 7(12): 700-7.
- 33 Walsh NC, Gravalles EM. Bone remodeling in rheumatic disease: a question of balance. *Immunol Rev*. 2010; 233(1): 301-12.
- 34 Haynes DR. Inflammatory cells and bone loss in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9(3): 104.

- 35 de Aquino SG, Abdollahi-Roodsaz S, Koenders MI, van de Loo FA, Pruijn GJ, Marijnissen RJ, et al. Periodontal pathogens directly promote autoimmune experimental arthritis by inducing a TLR2- and IL-1-driven Th17 response. *J Immunol.* 2014; 192(9): 4103-11
- 36 Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson N. Periodontal diseases. *Lancet.* 2005; 366(9499): 1809-20.
- 37 Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res.* 2006; 85(7): 596-607.
- 38 Souza PP, Lerner UH. The role of cytokines in inflammatory bone loss. *Immunol Invest.* 2013; 42(7): 555-622.
- 39 Gillespie MT. Impact of cytokines and T lymphocytes upon osteoclast differentiation and function. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9(2): 103.
- 40 Kitaura H, Zhou P, Kim HJJ, Novack DV, Ross FP, Teitelbaum SL. M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis. *J Clin Invest.* 2005; 115(12): 3418-27.
- 41 Itoh K, Udagawa N, Kobayashi K, Suda K, Li X, Takami M, et al. Lipopolysaccharide promotes the survival of osteoclasts via Toll-like receptor 4, but cytokine production of osteoclasts in response to lipopolysaccharide is different from that of macrophages. *J Immunol.* 2003; 170(7): 3688-95.
- 42 Holden JA, Attard TJ, Laughton KM, Mansell A, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide weakly activates M1 and M2 polarized mouse macrophages but induces inflammatory cytokines. *Infect Immun.* 2014; 82(10): 4190-203.
- 43 Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A. Tumor necrosis factor- α induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem.* 2000; 275(7): 4858-64.
- 44 Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, et al. Tumor necrosis factor α stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med.* 2000; 191(2): 275-86.
- 45 Souza PP, Palmqvist P, Lundberg P, Lundgren I, H  nstr  m L, Souza JA, et al. Interleukin-4 and interleukin-13 inhibit the expression of leukemia inhibitory factor and interleukin-11 in fibroblasts. *Mol Immunol.* 2012; 49(4): 601-10.
- 46 Onoe Y, Miyaura C, Kaminakayashiki T, Nagai Y, Noguchi K, Chen QR, et al. IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. *J Immunol.* 1996; 156(2): 758-64.
- 47 Abu-Amer Y. IL-4 abrogates osteoclastogenesis through STAT6-dependent inhibition of NF- κ B. *J Clin Invest.* 2001; 107(11): 1375-85.
- 48 Palmqvist P, Lundberg P, Persson E, Johansson A, Lundgren I, Lie A, et al. Inhibition of hormone and cytokine-stimulated osteoclastogenesis and bone resorption by interleukin-4 and interleukin-13 is associated with increased osteoprotegerin and decreased RANKL and RANK in a STAT6-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2006; 281(5): 2414-29.
- 49 Watanabe K, Tanaka Y, Morimoto I, Yahata K, Zeki K, Fujihira T, et al. Interleukin-4 as a potent inhibitor of bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 172(3): 1035-41.
- 50 Miossec P, Briolay J, Dechanet J, Wijdenes J, Martinez-Valdez H, Banchereau J. Inhibition of the production of proinflammatory cytokines and immunoglobulins by interleukin-4 in an ex vivo model of rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum.* 1992; 35(8): 874-83.

- 51 Riancho JA, Zarrabeitia MT, Gonzalez-Macias J. Interleukin-4 modulates osteoclast differentiation and inhibits the formation of resorption pits in mouse osteoclast cultures. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993; 196(2): 678-85.
- 52 Mangashetti LS, Khapli SM, Wani MR. IL-4 inhibits bone-resorbing activity of mature osteoclasts by affecting NF-kappa B and Ca²⁺ signaling. *J Immunol*. 2005; 175(2): 917-25.
- 53 Yu M, Moreno JL, Stains JP, Keegan AD. Complex regulation of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) expression by interleukin 4 (IL-4): IL-4 indirectly suppresses receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL)-mediated TRAP expression but modestly induces its expression directly. *J Biol Chem*. 2009; 284(47): 32968-79.
- 54 Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, et al. A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function. *Bone*. 1999; 25(1): 109-13.
- 55 Souza PP, Brechter AB, Reis RI, Costa CA, Lundberg P, Lerner UH. IL-4 and IL-13 inhibit IL-1 β and TNF- α induced kinin B1 and B2 receptors through a STAT6-dependent mechanism. *Br J Pharmacol*. 2013; 169(2): 400-12.
- 56 Kim J, Yang J, Park OJ, Kang SS, Kim WS, Kurokawa K, et al. Lipoproteins are an important bacterial component responsible for bone destruction through the induction of osteoclast differentiation and activation. *J Bone Miner Res*. 2013; 28(11): 2381-91.
- 57 Maekawa T, Krauss JL, Abe T, Jotwani R, Triantafilou M, Triantafilou K, et al. *Porphyromonas gingivalis* manipulates complement and TLR signaling to uncouple bacterial clearance from inflammation and promote dysbiosis. *Cell Host Microbe*. 2014; 15(6): 768-78.
- 58 Kassem A, Henning P, Lundberg P, Souza PP, Lindholm C, Lerner UH. *Porphyromonas gingivalis* stimulates bone resorption by enhancing RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) through activation of Toll-like Receptor 2 in osteoblasts. *J Biol Chem*. 2015; 290(33): 20147-58.
- 59 Qureshi ST, Larivière L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, et al. Endotoxin-tolerant mice have mutations in toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med*. 1999; 189(4): 615-25.
- 60 Nakamura H, Fukusaki Y, Yoshimura A, Shiraishi C, Kishimoto M, Kaneko T, et al. Lack of Toll-like receptor 4 decreases lipopolysaccharide-induced bone resorption in C3H/HeJ mice in vivo. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23(3): 190-5.
- 61 Palm E, Demirel I, Bengtsson T, Khalaf H. The role of toll-like and protease-activated receptors in the expression of cytokines by gingival fibroblasts stimulated with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Cytokine*. 2015; 76(2): 424-32.
- 62 Wang PL, Azuma Y, Shinohara M, Ohura K. Toll-like receptor 4-mediated signal pathway induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 273(3): 1161-7.
- 63 Itoh K, Udagawa N, Kobayashi K, Suda K, Li X, Takami M, et al. Lipopolysaccharide promotes the survival of osteoclasts via Toll-like receptor 4, but cytokine production of osteoclasts in response to lipopolysaccharide is different from that of macrophages. *J Immunol*. 2003; 170(7): 3688-95.
- 64 Mahanonda R, Pichyangkul S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontol 2000*. 2007; 43: 41-55.

- 65 Darveau RP, Pham TT, Lemley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, et al. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. Infect Immun. 2004; 72(9): 5041-51.
- 66 Asai Y, Hashimoto M, Fletcher HM, Miyake K, Akira S, Ogawa T. Lipopolysaccharide preparation extracted from Porphyromonas gingivalis lipoprotein-deficient mutant shows a marked decrease in toll-like receptor 2-mediated signaling. Infect Immun. 2005; 73(4): 2157-63.
- 67 Holt SC, Ebersole JL. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. Periodontol 2000. 2005; 38: 72-122.
- 68 Burns E, Bachrach G, Shapira L, Nussbaum G. Cutting Edge: TLR2 is required for the innate response to Porphyromonas gingivalis: activation leads to bacterial persistence and TLR2 deficiency attenuates induced alveolar bone resorption. J Immunol. 2006; 177(12): 8296-300.
- 69 Morandini AC, Chaves Souza PP, Ramos-Junior ES, Brozoski DT, Sipert CR, Souza Costa CA, et al. Toll-like receptor 2 knockdown modulates interleukin (IL)-6 and IL-8 but not stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) in human periodontal ligament and gingival fibroblasts. J Periodontol. 2013; 84(4): 535-44.
- 70 Polak D, Wilensky A, Shapira L, Halabi A, Goldstein D, Weiss EI, et al. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response. J Clin Periodontol. 2009; 36(5): 406-10.
- 71 Struillou X, Boutigny H, Soueidan A, Layrolle P. Experimental animal models in periodontology: a review. Open Dent J. 2010; 4: 37-47.
- 72 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(2): 89-105.
- 73 Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa C Jr. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. Front Oral Biol. 2012; 15: 117-32.
- 74 de Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, Chaves de Souza JA, Avila-Campos MJ, de Andrade CR, et al. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. J Periodontol. 2014; 85(3): 465-77.
- 75 de Molon RS, de Avila ED, Cirelli JA. Host responses induced by different animal models of periodontal disease: a literature review. J Investig Clin Dent. 2013; 4(4): 211-8.
- 76 Kassem A, Henning P, Lundberg P, Souza PP, Lindholm C, Lerner UH. Porphyromonas gingivalis stimulates bone resorption by Enhancing RANKL (Receptor Activator of NF-kappaB Ligand) through activation of Toll-like Receptor 2 in Osteoblasts. J Biol Chem. 2015; 290(33): 20147-58.
- 77 Chaves de Souza JA, Nogueira AV, Chaves de Souza PP, Kim YJ, Silva Lobo C, Pimentel Lopes de Oliveira GJ, et al. SOCS3 expression correlates with severity of inflammation, expression of proinflammatory cytokines, and activation of STAT3 and p38 MAPK in LPS-induced inflammation in vivo. Mediators Inflamm. 2013; 2013: 650812.
- 78 Chaves de Souza JA, Frasnelli SC, Curylofo-Zotti FA, Ávila-Campos MJ, Spolidório LC, Zamboni DS, et al. NOD1 in the modulation of host-microbe interactions and inflammatory bone resorption in the periodontal disease model. Immunology. 2016; 149(4): 374-85.

- 79 Kassem A, Lindholm C, Lerner UH. Toll-Like receptor 2 stimulation of osteoblasts mediates *Staphylococcus Aureus* induced bone resorption and osteoclastogenesis through enhanced RANKL . PLoS One. 2016; 11(6): e0156708.
- 80 Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y1, Bartova J, Janatova T, et al. *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. J Immunol Res. 2014; 2014: 476068.
- 81 Holden JA, Attard TJ, Laughton KM, Mansell A, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide weakly activates M1 and M2 polarized mouse macrophages but induces inflammatory cytokines. Infect Immun. 2014; 82(10): 4190-203.
- 82 Bendixen AC, Shevde NK, Dienger KM, Willson TM, Funk CD, Pike JW. IL-4 inhibits osteoclast formation through a direct action on osteoclast precursors via peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98(5): 2443-8.
- 83 de Molon RS, Mascarenhas VI, de Avila ED, Finoti LS, Toffoli GB, Spolidorio DM, et al. Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice. Clin Oral Investig. 2016; 20(6): 1203-16.

APÊNDICE A – Material e Método detalhado

MÉTODOS: CAPÍTULO 1

Cuidado com os animais

Foram utilizados 21 camundongos (*Mus musculus*, rodentia, muridae, C57Bl/6) machos com 10 semanas de vida, adquiridos junto ao Biotério central da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto. Durante os 24 dias do período experimental os animais foram mantidos no biotério de camundongos do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP em condições sanitárias de biotério convencional, com controle de temperatura (22 a 24°C) e luminosidade (12 h de ciclo claro/escuro). Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno padrão para camundongo (30 x 20 x 13 cm) com tampas gradeadas de arame galvanizado com tratamento antioxidante, com o número máximo de 7 animais por caixa. As caixas foram limpas três vezes por semana, com troca da serragem e alimentação durante todo período experimental. A alimentação foi constituída de ração para camundongo Nuvilab (Nuvital) e água fresca permanente de fornecimento local. O manejo dos roedores obedeceu às normas estabelecidas pelos procedimentos operacionais padrão do Comitê de Ética em Pesquisa animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP e pelos princípios éticos da experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, 2005).

Aplicação das Substâncias

Os animais foram levados à sala de procedimentos cirúrgicos da FOAr-UNESP e sedados em câmara de mistura de gases adaptada para murinos, com uma mistura 1:2 oxigênio-isoflurano (isoforine® – isoflurano 100% 1mL/1mL – Laboratório Cristália). Na sequência os animais foram imobilizados em dispositivo adaptado para acesso à região da maxila, e receberam injeções bilaterais com 3µL da substância de interesse para cada grupo: grupo controle (solução salina); grupo LPS (*Escherichia coli* 0127:B8 - 5µg em 3µL de solução salina); e grupo Pam2 (lipoproteína sintética diacilada – Pam₂CSK₄ – 1mg – InvivoGen® - agonista TLR2/TLR6 - 5µg em 3µL de solução salina). As injeções foram realizadas na gengiva

palatina, na região entre o primeiro e segundo molares usando uma agulha customizada em seringa de vidro com volume máximo de 10 μ L (seringa de 10 μ L – Microloliter™ #701 – Hamilton® USA). O tratamento teve seu curso ao longo de 24 dias, sendo realizado em intervalos de 24 horas até o fim o período experimental.

Eutanásia dos animais

Após 24 dias de indução da periodontite, a eutanásia dos animais se deu por deslocamento cervical pós sedação gasosa com isoflurano. Na sequência, as maxilas foram removidas, fixadas em paraformaldeído 4% tamponado por 24 horas, lavadas em água corrente por 2 horas e estocados em álcool 70% para realização de análise por microtomografia computadorizada e posterior descalcificação para processamento histológico.

Microtomografia computadorizada

As maxilas coletadas dos animais foram escaneadas utilizando-se um Sistema de imagem por μ CT (μ CT Skyscan 1176; Skyscan®, Kontich, Belgium). Para a obtenção das imagens, foram usados 18 μ m de resolução de espaço isotrópico com 57 kVp, 184 μ A e filtro de alumínio de 0.5 mm. Após a obtenção, a orientação espacial tridimensional foi padronizada para todos os espécimes (DataViewer software v1.5.2.4; Skyscan®, Kontich, Belgium). A análise da fração de volume ósseo (BV/TV) se deu com a utilização de um software destinado a esse fim (CT-Analyser software v1.10.1.0; Skyscan®, Kontich, Belgium) como descrito anteriormente (PARK, C. et al. 2007). Em síntese, no modelo de doença periodontal, a região de interesse (ROI), foi delimitada manualmente, dos ápices radiculares até a crista óssea alveolar, indo da raiz mesial do primeiro molar à raiz distal do terceiro molar. As raízes dentarias e o ligamento periodontal não foram incluídos na região de interesse (ROI).

Análise Histológica

As peças foram desmineralizadas em solução de EDTA (0.5M, pH 8.0) sob agitação à temperatura ambiente durante 6-8 semanas (com troca da solução 2x/semana), para posterior inclusão em parafina. Após a inclusão, foram realizados 3 cortes equidistantes com 45 μ m de intervalo entre os cortes de cada uma das amostras. A região dento-gengival adjacente, juntamente com as superfícies palatinas entre o primeiro e segundo molar superior

foram fotografados com câmera digital (Leica DFC 300, Leica® - Reichert Diastar Products & Jung, Wetzlar, Germany) acoplada em microscópio óptico com aumento de 200X (Leica DMLS, Leica® - Reichert Diastar Products & Jung, Wetzlar, Germany).

A análise histométrica foi realizada usando-se da sobreposição de uma grade com 32400 μm^2 com 9 $\times$ 4 quadrados de 30 μm , que foram reconstruídos em software de edição de imagens (Adobe Photoshop® CS5), sobre as imagens obtidas das secções histológicas. Um avaliador cego e calibrado avaliou os cortes corados com hematoxilina e eosina (HE) usando a técnica de ponto de contagem no plano bidimensional da grade. As proporções relativas dos seguintes componentes teciduais foram levadas a efeito: matriz extracelular, células inflamatórias e vasos sanguíneos.

Coloração histoquímica por TRAP

Para analisar a atividade dos osteoclastos no processo de reabsorção óssea, cortes das maxilas foram corados por técnica histoquímica usando um Kit de coloração por TRAP (Leukocyte Acid Phosphatase 387-A, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA). Os cortes em questão foram desparafinizados e reidratados, fixados em solução fixadora por 30 segundos e então incubados em solução para coloração por TRAP (contendo diazotized fast garnet, naftol AS-BI fosfato, acetato, e solução de tartarato) a 37°C por 60 minutos, como o descrito (DE MOLON, R. et al 2014). Após a contra coloração com hematoxilina de Harrys, os cortes foram desidratados novamente e cobertos com lamínulas para microscopia. O número total de células multinucleadas (com 3 núcleos ou mais) TRAP-positivas foram contadas nas faces vestibulares e palatinas das maxilas em uma área total de 245.877 μm^2 .

Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao D'Agostino-Pearson para análise da distribuição. Tendo os mesmos apresentado distribuição normal, foi realizada a comparação entre os grupos utilizando-se o teste t-student para o experimento de contagem de osteoclastos, visto que os mesmos só foram observados em dois grupos. Nos experimentos de PCR, foi realizado one-way ANOVA complementado pelo pós-teste de Tukey considerando-se $p \leq 0,05$.

MÉTODOS: CAPÍTULO 2

Cuidado com os animais

Foram utilizados 21 camundongos machos (*Mus musculus, rodentia, muridae, swiss mice*) com 4-5 semanas de idade. Os procedimentos experimentais foram conduzidos seguindo os preceitos estabelecidos pelo Comitê de ética para cuidado animal local (Processo - CEUA 11/2015). Os camundongos foram mantidos nas instalações do biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista de Araraquara - SP (FOAr UNESP), em ambiente climatizado com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas com oferta de água e ração *ad libitum*.

Procedimentos com os animais

Os animais foram divididos em 3 grupos: controle, controle positivo (PAM2) e grupo estudo (IL-4/Pam2). Os camundongos receberam injeções bilaterais na área localizada entre os primeiros e segundos molares superiores, em dias alternados, por um período de 15 dias. O grupo controle foi tratado com sessões de duas injeções de $3\mu\text{L}$ do veículo (PBS + BSA 0,1%); O grupo PAM2 recebeu uma dose de $3\mu\text{L}$ do veículo e uma dose de Pam₂CSK₄ (1ug/uL) após um intervalo de 30 minutos, por sessão; o grupo IL-4/PAM2 recebeu uma dose de IL-4 (100ug/mL) e uma dose de Pam₂CSK₄ com intervalo de 30 minutos. Após o período experimental de 15 dias, os animais foram eutanaziados, as maxilas extraídas, fixadas e preparadas para análise por microtomografia computadorizada e posteriormente preparadas para análise histológica.

Análise histológica

A análise estereométrica do processo inflamatório foi realizada com um microscópio óptico Leica DMLS (Leica - Reichert Diastar Products & Jung, Wetzlar, Germany) (200X). As áreas de interesse dos cortes pré-selecionados foram fotografadas com câmera digital Leica DFC 300 FX (Leica - Reichert Diastar Products & Jung, Wetzlar, Germany). 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: matriz extracelular, fibroblastos, células inflamatórias e vasos sanguíneos. A quantificação foi executada com o auxílio de grade confeccionada com 17,765 μm^2 de área que possuía 9 x 4 quadros com 30 μm de lado. Esta grade foi sobreposta na região do tecido conjuntivo imediatamente superior ao osso palatino entre o primeiro e segundo molar superior, com auxílio do software Adobe Photoshop CS4. Para cada corte, foram contados 50 pontos da grade que coincidiram sobre as estruturas histológicas. Em seguida, foi executada uma análise percentual de cada componente tecidual em relação ao número total de pontos contados.

Análise imunohistoquímica para TRAP

Os cortes histológicos montados em lâminas silanizadas foram submetidos a inativação da peroxidase endógena pela aplicação de peróxido de hidrogênio 3% por 10 minutos. Os epítomos inespecíficos foram bloqueados com protein Block (Abcam – USA) por 10 minutos. Sequencialmente, os cortes foram incubados por 16 horas nos anticorpos primários para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) (1:200) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA). Em seguida, os cortes foram tratados pelo método do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) e corados por DAB. Por fim, receberam contra-coloração com hematoxilina de Carrazi para evidenciação dos núcleos celulares. O número total de células TRAP positivas multinucleadas (≥ 3) foram contadas nos lados vestibular e palatino na região localizada entre os primeiros e segundos molares em uma área de 245,877 μm^2 .

Isolamento de macrófagos de medula óssea

Os macrófagos de medula óssea (MMO) foram obtidos a partir da técnica de lavagem da medula das tíbias e fêmures de camundongos com 5 semanas de idade ¹¹⁷. As células de medula óssea foram incubadas com 30 ng/mL de MCSF por 3 dias, seguidas por 24 horas de incubação com meio acrescido de MCSF e RANKL (4ng/mL). Os macrófagos aderidos foram semeados com densidade de 5×10^3 células/poço, em placa de cultura de células com 96 poços, em 200 μL do meio de cultura associada as substâncias que descrevem os grupos experimentais, por 24 horas assim, o Controle foi tratado apenas com MCSF (4ng/mL); o grupo PAM2, após 24 horas no meio contendo MCSF + RANKL (4ng/mL), recebeu 200 ng/mL of Pam₂CSK₄ com MCSF por 72 horas adicionais; O grupo Pam2+IL4, após 24 horas no meio contendo MCSF + RANKL, recebeu meio de cultura contendo Pam₂CSK₄ (200ng/mL), IL4

(50ng/mL) e MCSF (30 ng/mL) por 72 hours adicionais. Ao fim do período experimental, os poços foram fixados com paraformoldeído 4% tamponado, e corados para TRAP (Sigma Aldrich). As células multinucleadas TRAP+ (TRAP+ MuOCLs) foram contadas e levadas a efeito após a análise estatística pertinente. Os mesmos grupos foram replicados e destinados à extração de RNA para análise de expressão genica por RT q PCR.

Isolamento de osteoblastos de calvária

Os animais foram sacrificados por decapitação e os ossos da calvária foram imediatamente dissecados para isolamento dos osteoblastos. Este procedimento foi realizado por digestão enzimática sequencial, tal como descrito na literatura (Granhölm, Henning et al. 2013). Após o isolamento, as células foram mantidas em garrafas de 75cm² suplementadas com α -MEM + 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, Gibco, Grand Island, NY, USA) + penicilina (100UI/mL) + streptomycina (100 μ g/mL) (Invitrogen, Gibco, Grand Island, NY, USA) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico para que ocorra a proliferação das mesmas (quatro dias). As células foram contadas e utilizadas para realização dos experimentos, sendo cultivadas na densidade de 5 x 10⁴ células por well em placas para cultura de célula, na presença ou ausência das substâncias-teste.

Extração de RNA

O RNA total foi extraído de acordo com o protocolo para o kit RNAqueous-4PCR (Applied Biosystems – Foster City, CA, EUA). As células do periósteo foram lisadas com 350 μ L de tampão de lise. Para homogeneizar completamente, as amostras foram transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5mL e levadas ao vórtex. O mesmo volume (350 μ L) de etanol 64% foi adicionado ao lisado e misturado cuidadosamente. Essa mistura foi transferida para um filtro e centrifugada a 15000g por 15 s a 1 min ou até que toda a mistura tenha passado pelo filtro. O filtrado foi descartado e o “cartucho” do filtro foi utilizado nos passos seguintes. O volume total de 700 μ L da solução de lavagem número 1 foi passado pelo filtro, utilizando-se a 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 da solução de lavagem número 2/3. O filtro foi transferido para um novo tubo coletor. A solução de eluição (previamente aquecida a 70°C – 80°C) pipetada no centro do filtro. Uma alíquota de 15 μ L foi pipetada no centro do filtro e a solução centrifugada por 30 segundos.

Síntese do cDNA

Para cada amostra de RNA total extraído das amostras, foi sintetizado o cDNA (DNA complementar obtido a partir de um fragmento de RNAm) para a reação de PCR. Foi utilizado o protocolo do Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems – Foster City, CA, EUA). Inicialmente foi preparado o 2xRT master mix em tubo de microcentrífuga, o qual era composto por 2 µL do 10x RT Buffer, 0,2 µL do 25x dNTP Mix, 2 µL do 10x Random primers, 1 µL do MultiScribe[®] Reverse Transcriptase, 1 µL do RNase Inibitor, 3,2 µL de água ultra pura (volume para 1 reação). Em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, foi adicionado 10 µL de 2X RT master mix e 1 µg de RNAtotal e 9 µL de água ultra pura para completar 20 µL de volume final para cada reação. Em seguida, as amostras foram termocicladas a 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min.

PCR tempo real (RT qPCR)

O qPCR foi realizado em equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems – Foster City, CA, EUA) empregando-se para tal o conjunto de primers e sondas TaqMan, segundo o protocolo do fabricante (Applied Biosystems – Foster City, CA, EUA). Como gene constitutivo, foi selecionado um gene que não variou sua expressão nas condições testadas (foram testados 3). Foram utilizados 2 µL de cDNA diluído de acordo com a otimização realizada previamente num volume total de reação de PCR de 20 µL. Este volume incluiu, além do cDNA, água livre de nucleases, TaqMan universal PCR master mix e TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems – Foster City, CA, EUA) para os genes alvo. As condições pré-otimizadas de ciclagem foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e os ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O qPCR foi realizado e a expressão gênica tanto dos genes alvo quanto do gene constitutivo foi quantificada a partir de uma curva padrão realizada com diluição seriada de cDNA preparado a partir de RNA de referência. A quantificação relativa foi realizada e a expressão do gene foi expressa como vezes de aumento em comparação ao controle. O primers utilizados são apresentados na tabela que se segue.

Tabela A1: Primers e sequencias utilizadas no RT q PCR

Primer	Sequência
mRANK	S P (F) 5'-TGCCTACAGCATGGGCTTT-3'
	A P (R) 5'-AGAGATGAACGTGGAGTTACTGTTT-3'
mRANKL	S P (F) 5'-TGGAAGGCTCATGGTTGGAT-3'
	A P (R) 5'-CATTGATGGTGAGGTGTGCAA-3'
mOPG	S P (F) 5'-AGCTGCTGAAGCTGTGAAA-3'
	A P (R) 5'-GGTTCGAGTGGCCGAGAT-3'
mCTSK	S P (F) 5'-ATATGTGGGCCAGGATGAAAGTT-3'
	A P (R) 5'-TCGTTCCCCACAGGAATCTCT-3'
mTRAP	S P (F) 5'-CGACCATTGTTAGCCACATACG-3'
	A P (R) 5'-TCGTCCTGAAGATACTGCAGGTT-3'
mNFAT2	S P (F) 5'-TGAGGCTGGTCTTCCGAGTT-3'
	A P (R) 5'-CGCTGGGAACACTCGATAGG-3'

Micro-tomografia computadorizada

As mandíbulas foram analisadas usando o sistema de micro-tomografia computadorizada (Skyscan, 1176, Aartselaar, Kontich, Bélgica). O gerador de raios-X foi operado a 50 kVp e a corrente de feixe será de 500 mA, com um filtro de alumínio de 0,5 mm a uma resolução de imagem de 12,45 µm. As imagens serão reconstruídas com software específico (NRecon 1.6.1.5 - Skyscan, Kontich, Bélgica) em todas as três dimensões espaciais e, em seguida, todas as imagens foram orientadas e salvas em cortes sagitais (2000 x 1336), utilizando um software específico (Data Viewer 1.4.3.1 - Skyscan, Kontich, Bélgica).

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



Proc. CEUA nº 11/2015

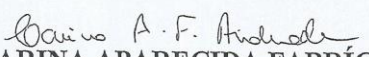
Araraquara, 28 de novembro de 2017.

Senhor Pesquisador:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade, procedeu a análise do Relatório Parcial do projeto de pesquisa de sua responsabilidade intitulado **"ENTENDENDO O PAPEL CATABÓLICO E ANABÓLICO DA INFLAMAÇÃO SOBRE O TECIDO ÓSSEO"** (Proc. CEUA nº 11/2015), e considerou-o APROVADO, bem como sua solicitação de alteração na metodologia da pesquisa.

Lembramos que o Relatório Final deste projeto deverá ser entregue em **AGOSTO/2018**.

Atenciosamente.


Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE
Coordenadora da CEUA

Ao
Prof. Dr. PEDRO PAULO CHAVES DE SOUZA
DD. Pesquisador Responsável
Departamento de Fisiologia e Patologia

ANEXO B – Comprovante de Submissão da Publicação 1



Lipoproteins induce periodontal destruction in mice

Journal:	<i>Journal of Periodontology</i>
Manuscript ID:	JOP-18-0073
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	31-Jan-2018
Complete List of Authors:	Cintra-Magalhães, Fernando; Universidade Federal do Maranhao, Patologia; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho - Campus de Araraquara, Fisiologia e Patologia Souza, João Antônio; Universidade Federal de Goiás, Department of Periodontology Zuanon, José Antônio; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho - Campus de Araraquara, Fisiologia e Patologia Pimentel Lopes de Oliveira, Guilherme José; UNESP, São Paulo State University, School of Dentistry, Periodontology de Molon, Rafael; Univ Estadual Paulista - UNESP, Department of Diagnosis and Surgery Souza, Pedro Paulo Chaves; Araraquara Dental School, São Paulo State University, Department of Pathology
Key Words:	Bone biology, Inflammation and innate immunity, Osteoclast(s)

**Não autorizo a reprodução deste trabalho até dia 02 de março de 2020
(Direitos de publicação reservado ao autor)**

Araraquara, 2 de março de 2018

Fernando Augusto Cintra Magalhães