

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 02/03/2020.



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).

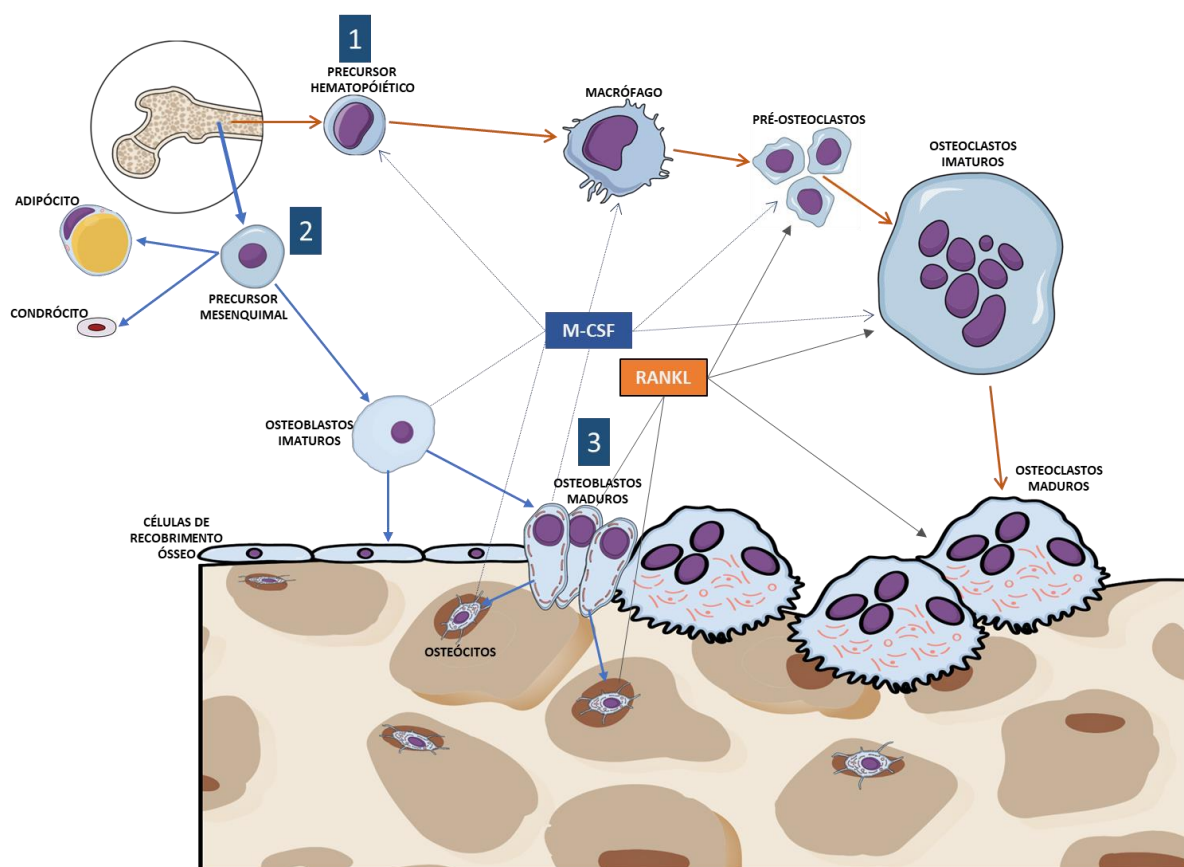
Figura 1 – Origem das células do tecido ósseo

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 contínua, 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

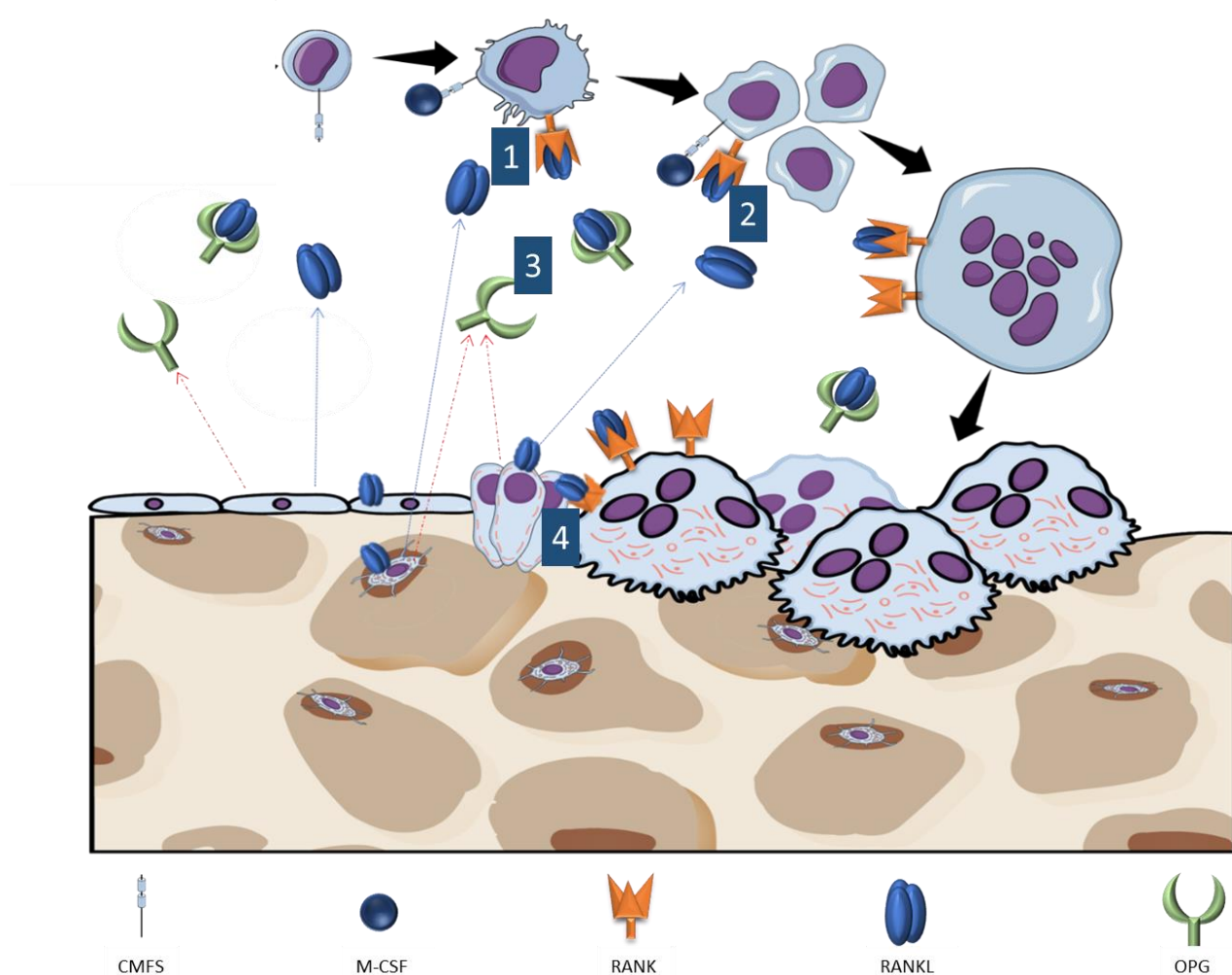


Figura esquemática da regulação da osteoclastogênese pelo Sistema RANK-RANKL-OPG. Macrófagos da medula óssea expressam receptores para MCSF e RANKL (1); osteoblastos e osteócitos secretam RANKL, a citocina chave para diferenciação de osteoclastos (2) que também pode ativas osteoclastos pelo contato célula 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

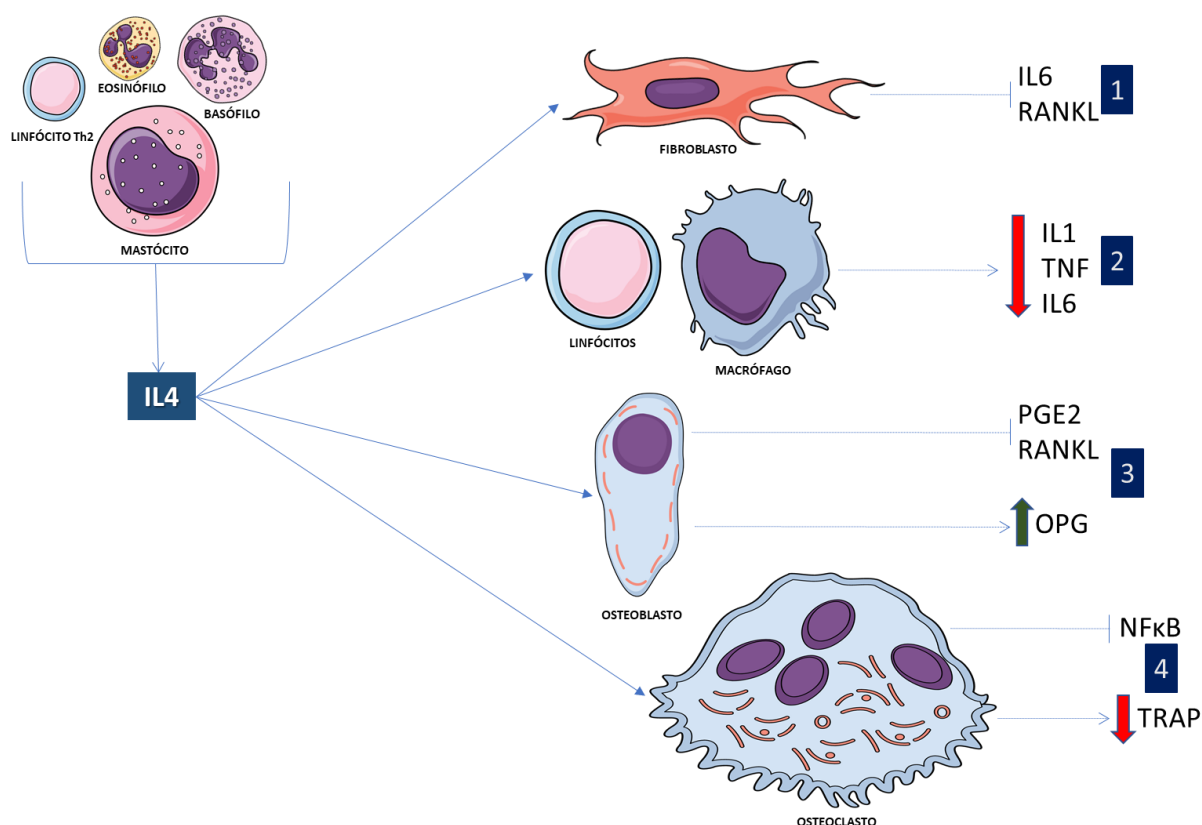
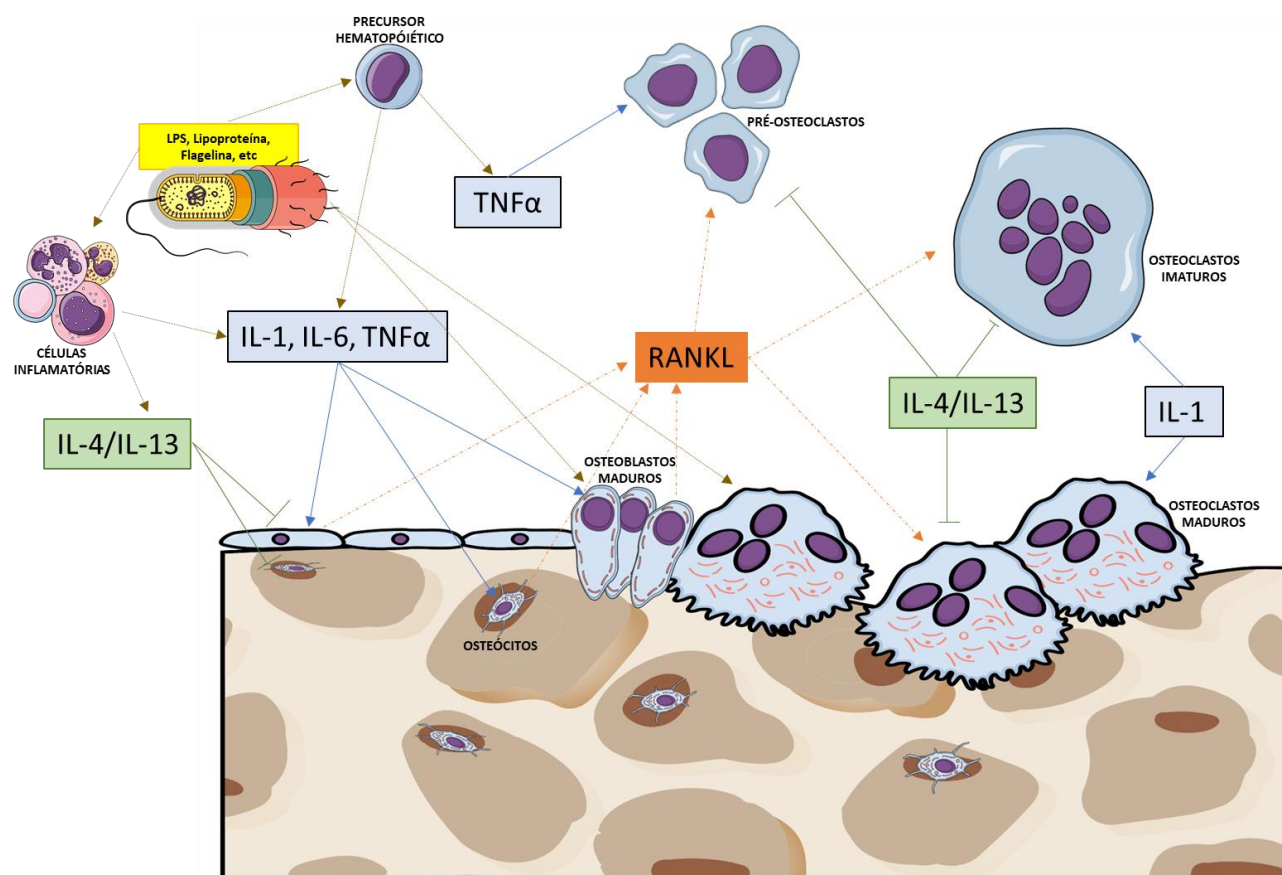


Ilustração esquemática da ação da IL-4 sobre células envolvidas direta ou indiretamente no metabolismo ósseo. Agindo sobre os fibroblastos (1), a IL-4 é capaz de inibir a produção de IL-6 e RANKL assim como diminuir a expressão de interleucinas de fenótipo osteolítico por parte dos linfócitos e macrófagos (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 $\text{TNF}\alpha$, 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

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.