



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE  
ARARAQUARA**



**RAFAEL SARTORI**

**Influência do FK-506 sobre a expressão de  
RANKL e OPG na doença periodontal induzida.  
Estudo in vivo e in vitro.**

**ARARAQUARA**

**2010**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE**  
**ARARAQUARA**



# **RAFAEL SARTORI**

**Influência do FK-506 sobre a expressão de RANKL e OPG na  
doença periodontal induzida. Estudo in vivo e in vitro.**

**TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA -  
ÁREA DE PERIODONTIA, DA FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA, DA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, PARA  
O TÍTULO DE DOUTOR EM ODONTOLOGIA.  
ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS ROSSA  
JUNIOR**

**ARARAQUARA**

**2010**

Sartori, Rafael

Influência do FK-506 sobre a expressão de RANKL e OPG na doença periodontal induzida. Estudo in vivo e in vitro / Rafael Sartori.– Araraquara: [s.n.], 2010.

131 f. ; 30 cm.

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

Orientador : Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

1. Tacrolimo 2. Inflamação 3. Periodontite 4. Linfócitos T  
5. Fibroblastos 6. Reabsorção óssea 7. Osteoprotegerina 8. Ligante RANK I. Título

# RAFAEL SARTORI

Influência do FK-506 sobre a expressão de RANKL e OPG na doença periodontal induzida. Estudo in vivo e in vitro.

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

2º Examinador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidório

3º Examinador: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

4º Examinador: Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado

5º Examinador: Profa. Dra. Paula Cristina Trevilatto

Araraquara, 31 de março de 2010.

# ***DADOS CURRICULARES***

## ***RAFAEL SARTORI***

**NASCIMENTO** 18 de Setembro de 1976 - União da Vitória/PR

**FILIAÇÃO** Eli Sartori  
Geni Miralva Sartori

**1994-1998** Graduação em Odontologia  
Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG

**2004-2006** Pós-graduação em Periodontia – Nível de Mestrado  
Faculdade de Odontologia de Araraquara  
Universidade Estadual Paulista - UNESP

**2006-2010** Pós-graduação em Periodontia – Nível de Doutorado  
Faculdade de Odontologia de Araraquara  
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Tenha coragem, persista, não aceite a derrota,  
não desista dos parâmetros traçados, dê movimento construtivo ao seu  
ideal.

Na caminhada para alcançar seus objetivos, seja forte e perscrutador.

Você será necessariamente confrontado por muitos obstáculos,  
vencê-los significa, em primeiro lugar, vencer a si mesmo.

Coragem, firmeza, paciência, disciplina, faça autoconhecimento.

Desenvolva a autoconfiança e você saberá abrandar, suavizar,  
os revezes, as lutas que compõem a experiência terrena.

Não receie o fracasso.

Empenhe-se a fundo naquilo que quer alcançar,  
avaliar para ver se é justo e digno, e continue a jornada crendo em Deus  
e tudo se realizará para o bem.

*Leocádio José Correia*

## *DEDICATÓRIA*

### AOS MEUS PAIS

#### *ELI e GENI*

Que sempre se fizeram presentes em todos os momentos, firmes e trêmulos, de alegria e tristeza, de risos e lágrimas, entusiasmo e desânimo, transmitindo-me a segurança e a força necessária para seguir meu caminho.

A vocês que acompanharam com tanta paciência e compreensão esta trajetória e que, no incomparável e incondicional amor, forneceram-me todos os subsídios para ser o que hoje sou, na verdade um pouco de cada um de vocês.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

**A Deus,**

que por sua bondade me concedeu a vida e por me dar forças para superar as dificuldades na busca de meus ideais.

Aos meus irmãos **Elisa e Fábio, Alexandre e Patrícia, Luciana e Márcio**, pelo carinho, amor, apoio em todos os momentos.

À minha avó, **Graciosa**, pelos seus ensinamentos e orações durante minha vida, compreendendo a minha ausência neste período.

Às minhas famílias, **Sartori, Zempulski, Jorgensen, Munhoz, Mazzer, Godofredo**, por sempre acreditarem em mim, dando-me apoio em todos os momentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. **Carlos Rossa Junior** pela confiança em mim depositada, por compreender os meus anseios e me dar o incentivo necessário para atingir os meus objetivos.

Aos meus grandes amigos **Maurício, Rafael, Joseane e Milton**, que sempre estiveram ao meu lado, em todos os momentos durante nosso convívio. Obrigado pela confiança e amizade.

Ao meu amigo **Humberto**, pelo convívio e amizade, e principalmente pela residência compartilhada durante a pós-graduação.

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, na pessoa do seu diretor Prof. Dr. **José Cláudio Martins Segalla**, pela oportunidade e condições oferecidas para a realização deste curso.

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação em Periodontia Prof. Dr. **Joni Augusto Cirelli**, e a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação em Periodontia, pela excelente formação, dedicação e competência em suas atividades.

Aos Professores da Disciplina de Periodontia desta faculdade, **Egbert, Ricardo, Elcio, José Eduardo, Adriana, Silvana, Joni e Carlos**, pelos conhecimentos transmitidos, pelo incentivo constante, por toda a dedicação e pela convivência amigável que tivemos ao longo de todo o curso.

Aos meus colegas de doutorado, **Daniela Zandim, Fábio, Rafael Faeda, Gabriela, Roberto e Rafaela**, pelo convívio e amizade.

Aos colegas do laboratório de biologia molecular e celular, **Fábio, Morgana, Sabrina, Telma e João**, pela auxílio fundamental na realização desta tese e pela amizade compartilhada.

A todos os **colegas** do curso de Pós-Graduação em Periodontia, pela convivência e amizade.

A todos os funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, em especial à **Cláudia, Zezé, Maria do Rosário e Ester**, pela amizade e carinho.

À minha amiga, **Regina Lúcia**, em especial, pela amizade e cooperação sempre disponíveis, pela competência e administração nos seus trabalhos

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **Mara, Rosângela, Flávia e Alexandre**, pela amizade, competência e paciência.

A todos os funcionários desta faculdade, em especial aos funcionários da  
Biblioteca, pela atenção e auxílio.

A **CNPq** e a **FAPESP** pelo apoio financeiro concedido.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram e tornaram possível a  
realização deste trabalho.

## **SUMÁRIO**

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	12
<b>RESUMO</b> .....	14
<b>ABSTRACT</b> .....	17
<b>INTRODUÇÃO REVISADA</b> .....	21
<b>PROPOSIÇÃO</b> .....	34
<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	36
<b>RESULTADO</b> .....	51
CAPÍTULO 1 .....	52
CAPITULO 2 .....	67
OUTROS RESULTADOS .....	86
<b>DISCUSSÃO</b> .....	98
<b>CONCLUSÃO</b> .....	113
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	116

## ***ABREVIATURAS***

RANKL - Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand

OPG - Osteoprotegerin

RANK - Receptor activator of NF- $\kappa$ B

PTH – Parathyroid hormone

TNF- $\alpha$  – Tumor Necrosis Factor – alpha

LPS – Lipopolysaccharide

PGE<sub>2</sub> – Prostaglandin E<sub>2</sub>

IL (-1; -2; -6) – Interleukin (-1; -2; -6)

MAPK - Mitogen-activated protein kinase

ERK - Extracellular-regulated kinase

TCR – T cell receptor

TLR – Toll like receptor

IL-1R - Interleukin-1 receptor

TNFR – Tumor Necrosis Factor Receptor

JNK – c-Jun N-terminal kinase

AP-1 – Activator protein 1

PKC – Protein Kinase C

PKA – Protein Kinase A

NF- $\kappa$ B - Nuclear Factor kappa B

IRAK – Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase

TRAF6 – TNF Receptor Associated Factor 6

IKK – I $\kappa$ B Kinase

I $\kappa$ B – Inhibitor of NF- $\kappa$ B

NFAT – Nuclear Factor of Activated T cells

FKBP12 - FK506-binding protein 12

DNA – Deoxyribonucleic Acid

RNA – Ribonucleic Acid

SPF – Specific Pathogen Free

RT-PCR – Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction

FBS – Fetal Bovine Serum

PBS – Phosphate Buffer Solution

BSA – Bovine Serum Albumin

cDNA – complementary DNA

STAT – Signal Transducer and Activator of Transcription

## **RESUMO**

Sartori, R. Influência do FK-506 sobre a expressão de RANKL e OPG na doença periodontal induzida. Estudo in vivo e in vitro [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

Embora a doença periodontal tenha origem infecciosa, ela se caracteriza por uma complexa resposta imune-inflamatória, com a participação de células residentes e não-residentes, produzindo diversas citocinas e mediadores biológicos. A principal característica da doença periodontal destrutiva é a reabsorção do osso alveolar, a qual é uma consequência frequentemente irreversível do processo patológico e das citocinas produzidas pela resposta do hospedeiro. Citocinas específicas atuam diretamente no controle da remodelação óssea, denominadas RANKL (*Receptor activator of NF-kB ligand*) e OPG (*Osteoprotegerin*). RANKL é uma proteína produzida por fibroblastos, osteoblastos, condrócitos, células mesenquimais e células T e B ativadas e sua ligação com o seu receptor RANK (*Receptor activator of NF-kB*) em células precursoras de osteoclastos é necessário e suficiente para a ativação, diferenciação e sobrevivência de osteoclastos maduros. OPG, a outra proteína envolvida nesta modulação, serve como um falso receptor para RANKL, impedindo dessa forma a ligação RANKL-RANK e levando a uma menor ativação de osteoclastos. Assim, o balanço entre RANKL e OPG é o atual paradigma

para a modulação da remodelação óssea. FK-506 (tacrolimo) é uma droga imunossupressora usada para prevenir rejeição de enxertos afetando a ativação de linfócitos T por meio da modulação da via da calcineurina, inibindo a ativação de NFAT e de NF- $\kappa$ B. Estudos prévios demonstraram que o uso de tacrolimo em ratos diminuiu a resposta inflamatória e reabsorção óssea em modelo experimental de indução de doença periodontal. A proposta deste estudo foi avaliar os efeitos da administração sistêmica do tacrolimo sobre a expressão de RANKL e OPG na doença periodontal induzida em ratos e determinar in vitro, se o tratamento de células residentes do periodonto com tacrolimo previamente ao estímulo com LPS bacteriano e IL-1 seria capaz de modular a expressão de RANKL e OPG. No estudo in vivo, foram utilizados dois modelos experimentais de indução da doença periodontal, LPS e ligadura, em ratos. No grupo teste, os animais receberam diariamente injeções intraperitoneais de tacrolimo (1mg/kg) . Após 30 dias, os animais foram sacrificados e os tecidos das regiões de interesse foram coletados. A administração de tacrolimo resultou em inibição do RNAm de RANKL e aumento de RNAm de OPG apenas doença periodontal induzida por ligadura. A avaliação por imunohistoquímica revelou que o tratamento com tacrolimo inibiu a expressão de RANKL nos tecidos periodontais e um decréscimo no número de linfócitos T, nos dois modelos utilizados. No estudo in vitro, foram utilizados linhagens celulares de fibroblastos, osteoblastos e linfócitos T. O tacrolimo reduziu a

expressão de RNAm de RANKL em fibroblastos e osteoblastos, bem como a ativação de p38 MAPK e NF- $\kappa$ B, após estímulo com LPS e IL-1. O tratamento com o imunossupressor também foi efetivo na inibição de proliferação de células T e de fibroblastos. Como conclusão, o tacrolimo foi efetivo em suprimir a expressão de RANKL tanto in vivo quanto in vitro. A expressão de OPG teve alterações menos marcantes após o tratamento com tacrolimo, no entanto a modulação da proporção relativa destes genes sugere um efeito inibidor sobre a atividade de reabsorção óssea. Nossos resultados indicam que os mecanismos pelos quais o tacrolimo pode inibir a reabsorção óssea incluem: regulação da expressão de RANKL/OPG, redução do número de linfócitos nos tecidos periodontais, e modulação das vias de sinalização intracelular p38 MAPK e NF- $\kappa$ B, envolvidas na expressão de citocinas inflamatórias.

Palavras-chave: Tacrolimo, Inflamação, Periodontite, Linfócitos T, Fibroblastos, Reabsorção óssea, Osteoprotegerina, Ligante RANK.

## **ABSTRACT**

Sartori, R. Effect of FK-506 over RANKL and OPG expression in experimental periodontal disease. An in vivo and in vitro study. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

Periodontitis is a well-characterized infectious disease with a complex immune-inflammatory response. In response to the bacterial presence, many resident and non-resident cells into the peridontium produce many cytokines and biologic mediators, causing tissue destruction and alveolar bone loss. These cytokines are the key-factor in osteoclast-mediated bone resorption. The expression ratio between two cytokines is fundamental to bone resorption process: RANKL (*Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand*) that is necessary to osteoclast differentiation, activation and survival, and OPG (*Osteoprotegerin*) that acts as the endogenous inhibitor of RANKL by functioning as its decoy receptor. RANKL is expressed by fibroblasts, osteoblasts, chondrocytes, mesenchymal cells and T and B lymphocytes. OPG is secreted primarily by osteoblastic cells, bone marrow stromal cells and fibroblasts and it counter regulates the excessive bone loss antagonizing the RANKL-binding to its receptor RANK in osteoclast precursor cells. The ratio between RANKL and OPG is the current paradigm for modulation of coupled bone turnover. FK-506 is an immunosuppressive drug used to reduce and to prevent the risk of organ

transplant rejections. It acts affecting T lymphocyte activation by calcineurin pathway modulation inhibiting NFAT and NF- $\kappa$ B translocation to the nucleus. Previous studies showed that animals with experimental periodontitis treated with FK-506 exhibited less bone resorption and inflammatory infiltrate. The purpose of this study was evaluated effects of FK-506 systemic administration over RANKL and OPG expression in animals with experimental periodontitis; and determines if FK-506-treated periodontium resident cells can affect IL-1- and LPS-induced RANKL and OPG expression. In the in vivo study, two experimental periodontitis models were used (LPS and ligature) in rats. In the test group the animals received daily intraperitoneal injections of FK-506 (1mg/kg). At the 30<sup>th</sup> day the animals were sacrificed and samples from regions of interested were collected. The FK-506 administration resulted in inhibition of RANKL mRNA and OPG mRNA increase only on ligature model. The immunohistochemistry analysis showed that FK-506 treatment inhibited RANKL on periodontal tissues and T lymphocyte decrease in both models. Fibroblastic lineage, and osteoblastic lineage, and T lymphocytes were used to the in vitro study. Treatment with FK-506 decreased IL-1- and LPS-induced RANKL mRNA expression on fibroblasts and osteoblasts as well as p38 MAPK and NF- $\kappa$ B. The FK-506 also was effective inhibiting T cells and fibroblasts proliferation. In conclusion, FK-506 suppressed RANKL expression as many in vivo as in vitro. The OPG expression had less remarkable alterations after FK-506 treatment. However, the relative

modulation of these genes suggests an inhibitor effect in the bone resorption activity. Our results indicate that the mechanisms by the FK-506 can modulate bone resorption include: regulation of RANKL/OPG expression, decreasing the number of lymphocytes on periodontal tissues, and modulation of p38 MAPK and NF- $\kappa$ B pathway.

Keywords: Tacrolimus, inflammation, periodontitis, T lymphocytes, fibroblasts, bone resorption, osteoprotegerin, RANKL.

INTRODUÇÃO REVISADA

## **1. INTRODUÇÃO REVISADA**

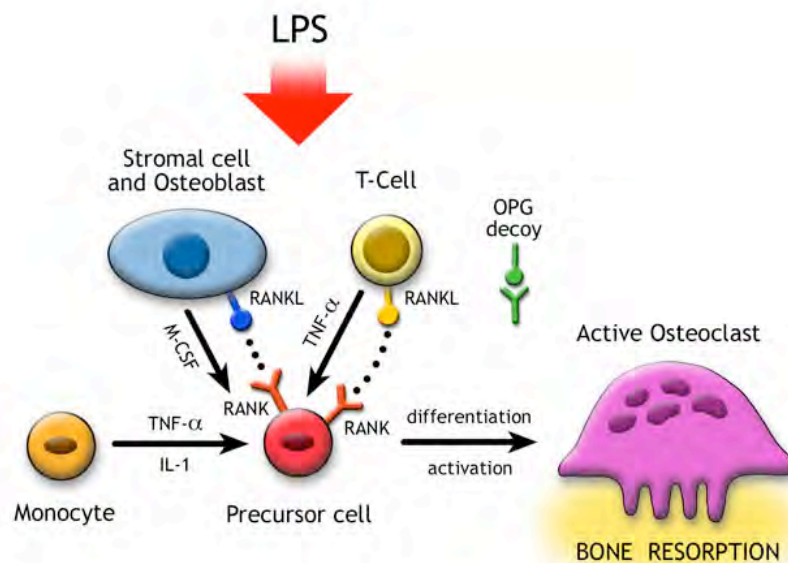
A doença periodontal é uma condição de origem infecciosa que apresenta uma complexa resposta imune-inflamatória, com a participação de células residentes e não-residentes, as quais produzem diversos mediadores biológicos que regulam a resposta imune. A principal característica da doença periodontal destrutiva é a reabsorção do osso alveolar, a qual é uma consequência frequentemente irreversível do processo patológico. No microambiente periodontal, toxinas e componentes bacterianos derivados do biofilme dental induzem uma resposta imune com a produção de diversas citocinas pelo hospedeiro, sendo a produção destas citocinas amplificada em quantidade e complexidade devido aos efeitos autócrinos e parácrinos destas próprias citocinas sobre as células do hospedeiro. Embora a resposta imune, e a complexa rede de citocinas estabelecida, tenha a finalidade de eliminar o agente patológico, considera-se que a maior parte da atividade de degradação tecidual, incluindo a reabsorção do osso alveolar, sejam causados pelas citocinas derivadas da resposta imune do hospedeiro (Graves<sup>18</sup>, 2008; Seymour, Gemmell<sup>51</sup>, 2001).

O osso é um tecido dinâmico sob constante estado de remodelação, o qual se caracteriza por um balanço delicado entre a atividade de reabsorção da matriz óssea por osteoclastos e de formação da matriz óssea por osteoblastos. Um grande avanço na compreensão do

controle do processo de remodelação do tecido ósseo foi a identificação de um sistema de citocinas diretamente envolvidas na diferenciação e ativação de osteoclastos, denominadas RANKL (*Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand*), OPG (*Osteoprotegerin*) e o receptor de membrana RANK (*Receptor activator of NF- $\kappa$ B*) (Suda et al.<sup>54</sup>, 1999).

RANKL é uma proteína produzida por fibroblastos, osteoblastos, condrócitos, células mesenquimais e células T e B ativadas, podendo ser secretada ou expressa na superfície celular, enquanto seu receptor, RANK, está presente na superfície de células precursoras de osteoclastos, osteoclastos maduros e células dendríticas. A produção de RANKL e sua ligação com seu receptor de membrana RANK é um evento considerado tanto necessário quanto suficiente para a ativação e diferenciação de células monocíticas em osteoclastos maduros (Boyle et al.<sup>4</sup>, 2003; Khosla<sup>29</sup>, 2001; Teitelbaum<sup>61</sup>, 2000). Já OPG, uma proteína produzida e secretada principalmente por pré-osteoblastos, osteoblastos e células do estroma ósseo, atua como regulador negativo da osteoclastogênese, funcionando como falso receptor para RANKL. Como OPG é uma proteína secretada, portanto sem porção citoplasmática, a ligação de OPG com RANKL reduz a biodisponibilidade de RANKL capaz de interagir com RANK presente na superfície de células precursoras de osteoclastos e, conseqüentemente, a ativação de osteoclastos (Suda et al.<sup>54</sup>, 1999; Boyle et al.<sup>4</sup>, 2003; Hofbauer et al.<sup>23</sup>, 2001; Komarova et al.<sup>34</sup>, 2003). Assim, o paradigma atual do controle da remodelação óssea se

baseia na relação entre a produção de RANKL e OPG no microambiente ósseo (Figura 1). Esta relação RANKL/OPG tem basicamente a função de controlar o processo de reabsorção óssea, controlando a contínua remodelação da matriz óssea em resposta a diversos estímulos externos e mantendo a homeostasia do tecido ósseo (Walsh et al.<sup>65</sup>, 2006). Este papel fundamental do sistema RANKL/OPG na modulação do tecido ósseo justifica o interesse nos mecanismos de regulação da expressão gênica como abordagem terapêutica de doenças e condições que afetam o tecido ósseo.



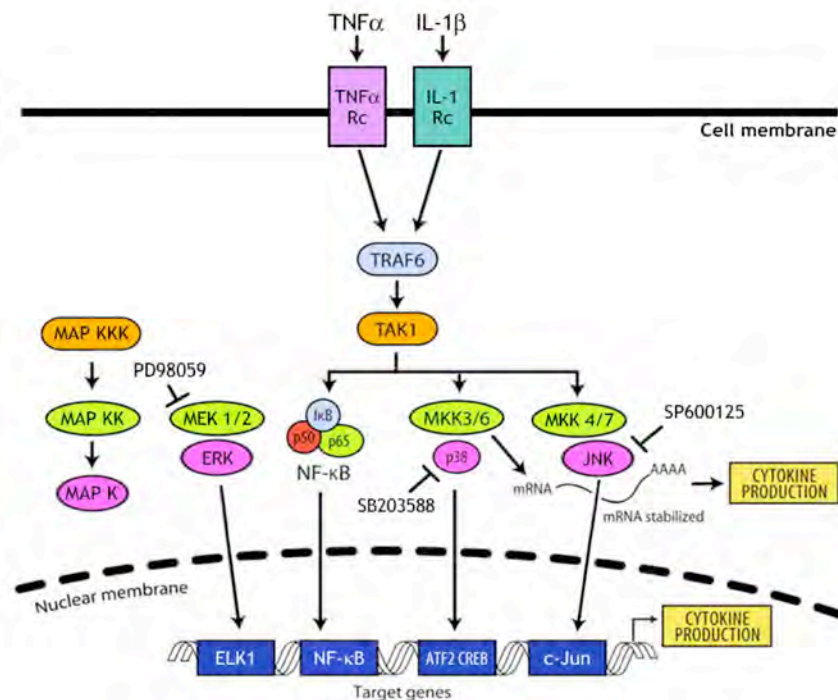
**FIGURA 1:** Modelo ilustrativo da participação de RANKL e OPG na osteoclastogênese induzida por LPS e citocinas inflamatórias (Adaptado de Kirkwood KL et al. *Periodontol* 2000 2007; 43:294-315).

Osteoblastos expressam RANKL quando estimulados por alguns fatores como vitamina D3, PTH (Parathyroid hormone), TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α) e prostaglandinas (Tanaka et al.<sup>59</sup>, 2005). As

células do ligamento periodontal, principalmente fibroblastos, também desempenham papel fundamental no metabolismo ósseo alveolar, secretando OPG e RANKL. Do mesmo modo que os osteoblastos, a expressão de RNA mensageiro de RANKL e OPG em fibroblastos é afetada pela presença de LPS (Lipopolissacarídeo), vitamina D3, PTH, TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> e IL-1 (Interleukin-1) (Fukushima et al.<sup>14</sup>, 2005; Wada et al.<sup>64</sup>, 2004; Zhang et al.<sup>66</sup>, 2004).

Em células do ligamento periodontal, a presença de LPS leva à produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , suficiente para induzir a expressão de RANKL (Wada et al.<sup>64</sup>, 2004), sugerindo um feedback positivo para a produção desta proteína. Diferentes vias de sinalização intracelular estão envolvidas na regulação da expressão de RANKL nestas células, incluindo diferentes membros da família das MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*). A indução de RANKL por IL-1 em células do ligamento periodontal requer a ativação de ERK (*Extracellular-regulated kinase*) (Fukushima et al.<sup>14</sup>, 2005) Entretanto, a indução de RANKL por LPS de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Escherichia coli* em células do ligamento periodontal ocorre pela ativação da via p38 MAPK (Rossa et al.<sup>47</sup>, 2008). Como diferentes estímulos e vias de sinalização intracelular podem participar da regulação de RANKL, diferentes receptores na superfície celular também estão implicados na produção de RANKL. Assim, receptores como TCR (T cell receptor), TLR-4 (Toll like receptor-4), IL-1R (Interleukin-1 receptor) e TNFR (Tumor Necrosis Factor

Receptor) podem desencadear eventos intracelulares que levam à produção de RANKL (Figura 2).



**FIGURA 2** – Esquema representativo de ativação das vias das MAPKinases e NF-κB na sinalização intracelular de citocinas inflamatórias. A ligação de citocinas inflamatórias com seus receptores celulares específicos desencadeia a ativação seqüencial (usualmente por fosforilação) de diversas proteínas intracelulares até a ativação de proteínas sinalizadoras que se translocam para o interior do núcleo celular (por ex., p38, ERK, JNK, NF-κB) onde, em conjunto com a remodelação da cromatina por histonas, levam à ativação de diversos fatores de transcrição (por ex., ELK1, NF-κB, ATF2, c-Jun) que resultam na modulação da expressão gênica, estabelecendo a resposta celular ao estímulo externo. À esquerda está representado o esquema-geral de ativação das MAPKinases: ativação seqüencial de MAP kinase-kinase-kinase leva à ativação de uma MAP kinase-kinase, a qual ativa uma MAP kinase. Também estão representados os inibidores bioquímicos específicos de cada uma das MAPKinases: SB203580 (p38), SP600125 (JNK) e PD98059 (ERK).

De forma similar às células do ligamento periodontal, em osteoblastos, outro tipo celular ‘residente’ ou não-imune, diferentes

estímulos, receptores e vias de sinalização intracelular estão envolvidos na regulação da expressão de RANKL. A ativação de receptores TLR2 em osteoblastos por LPS de *P. gingivalis* aumenta a expressão gênica de RANKL via AP-1 (Activator protein 1) e JNK (c-Jun N-terminal Kinase), enquanto que a ativação de TLR4 leva a um aumento de RANKL via p38 MAPK, ERK e PKC (*protein kinase C*) (Okahashi et al.<sup>43</sup>, 2004; Kikuchi et al.<sup>30</sup>, 2001). Citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 e PGE<sub>2</sub> também induzem à expressão de RANKL em osteoblastos e a presença de LPS pode tanto induzir diretamente a expressão de RANKL, quanto estimular osteoblastos e/ou células adjacentes a secretar estas citocinas e levar ao aumento da produção de RANKL indiretamente (Kikuchi et al.<sup>30</sup>, 2001).

O fato de citocinas inflamatórias produzidas na resposta imune inata por células residentes também induzir a expressão de RANKL por osteoblastos indica que tanto os receptores para estas citocinas quanto as diferentes vias de sinalização intracelular ativadas por estes receptores, como Cálcio e PKC (Takami et al.<sup>57</sup>, 2000), ERK, p38 MAPK e PKA (Protein Kinase A) (Takami et al.<sup>56</sup>, 2005) podem exercer papel relevante no controle da reabsorção óssea durante a doença periodontal. O estímulo com IL-1 $\beta$  também induz à produção de RANKL em células do estroma ósseo onde a ativação da via p38 MAPK mostrou-se um componente essencial para a expressão gênica (Rossa et al.<sup>46</sup>, 2006).

A interação RANKL/RANK resulta numa série de eventos intracelulares até a ativação do NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa B). Diversas

proteínas são ativadas em cascata (IRAK, Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase; TRAF6, TNF Receptor Associated Factor 6; IKK, I $\kappa$ B Kinase; I $\kappa$ B, Inhibitor of  $\kappa$ B) culminando na translocação do NF- $\kappa$ B ao núcleo onde interage com o DNA (Deoxyribonucleic Acid) na região promotora de diversos genes-alvo específicos, os quais, entre outras atividades, levam à diferenciação de células monocíticas em osteoclastos e ativação destes (Suda et al.<sup>54</sup>, 1999). Outras vias de sinalização intracelular também são ativadas por RANKL, como JNK, ERK, p38 MAPK e a calcineurina, que leva à translocação do NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) ao núcleo. Esta translocação é devida à desfosforilação do NFAT pela calcineurina, onde dentro do núcleo liga-se a genes específicos, principalmente àqueles envolvidos em interações célula-célula (Crabtree, Olson<sup>8</sup>, 2002). Em células precursoras, NFAT-c1 é o fator de transcrição principal para osteoclastogênese. A auto-amplificação resulta em eficiente indução de genes específicos para osteoclastogênese (Takayanagi<sup>58</sup>, 2005).

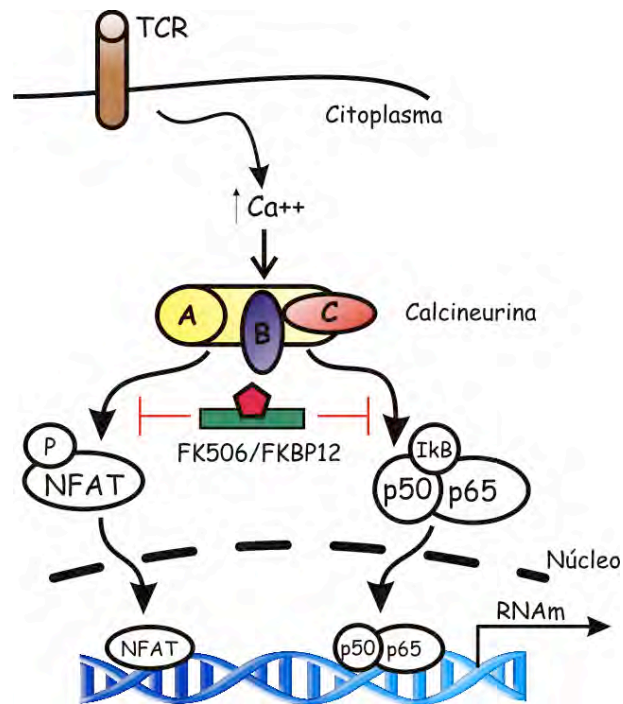
Além disso, o NFAT em células precursoras de osteoclastos, leva à produção de IL-2 (Interleukin-2), citocina responsável pela proliferação de células T e produção de outras citocinas (Hirota et al.<sup>21</sup>, 2004). As células T ativadas são grandes produtoras de RANKL, tendo assim papel fundamental no processo da osteoclastogênese (Boyle et al.<sup>4</sup>, 2003; Khosla<sup>29</sup>, 2001; Teitelbaum<sup>61</sup>, 2000).

Sabe-se que células residentes do periodonto, como fibroblastos, neutrófilos e osteoblastos, desempenham importante papel para o início da resposta inflamatória frente à presença do antígeno bacteriano, secretando diversas citocinas como IL-1, TNF- $\alpha$ , RANKL e OPG (Wada et al.<sup>64</sup>, 2004; Cochran<sup>6</sup>, 2008).

A presença destas citocinas, bem como a manutenção da atividade inflamatória, leva ainda à participação do sistema imune adaptativo. Existem evidências demonstrando a importância de células T na reabsorção óssea associada à doença periodontal, com uma forte correlação entre grau de reabsorção óssea e presença de linfócitos. Lesões periodontais ativas são caracterizadas por grande infiltração de células T (Kawai et al.<sup>28</sup>, 2006; Taubman et al.<sup>60</sup>, 1984), e por meio de microscopia confocal, foi demonstrado que estas células são importantes fontes de RANKL na reabsorção óssea periodontal (Kawai et al.<sup>28</sup>, 2006).

A capacidade da IL-2 de estimular a proliferação de células T levou à suposição de que também teria atividade na modulação das respostas destas células (Nelson<sup>42</sup>, 2004). O conceito de que a expressão de IL-2 era diretamente proporcional ao número e atividade de células T, proporcionou o desenvolvimento de terapias baseadas no controle da expressão de IL-2. Assim, a inibição de sua expressão é empregada na imunossupressão para evitar a rejeição de transplantes (Morris, Waldmann<sup>39</sup>, 2000). Um exemplo disso é o Tacrolimo (FK-506), um imunossupressor que atua na via da calcineurina, inibindo a produção de

IL-2. O tacrolimo forma um complexo com proteínas intracelulares, como a FKBP12 (*FK506-binding protein 12*) e inibe seletivamente a atividade enzimática da calcineurina (uma fosfatase dependente de Cálcio/calmodulina), impedindo a transcrição de IL-2. Tal ação ocorre por meio da inibição da desfosforilação de NFAT e da dissociação da subunidade reguladora I $\kappa$ B do NF- $\kappa$ B, prevenindo a translocação destes para o núcleo onde interagiriam com as seqüências de DNA apropriadas no promotor do gene da IL-2, iniciando a transcrição (Kino et al.<sup>31</sup>, 1987; Kino et al.<sup>32</sup>, 1987) (Figura 3). Imunossupressores, como o tacrolimo, são usados também para o tratamento da artrite reumatóide, uma doença auto-imune com marcante inflamação e reabsorção óssea (Suematsu et al.<sup>55</sup>, 2007), sugerindo um efeito modulador dos imunossupressores sobre as doenças inflamatórias.



**FIGURA 3:** modelo ilustrativo da forma de atuação do FK506 com a proteína FKBP12. A ligação entre essas duas proteínas impede a translocação para o núcleo dos fatores de transcrição NFAT e NF-κB.

A ação do tacrolimo sobre o tecido ósseo tem sido investigada. Spolidório et al. (Spolidório et al.<sup>52</sup>, 2007) verificaram, em ratos que recebiam terapia com Ciclosporina, uma diminuição do volume ósseo e um aumento de osteoclastos ao final de 60 dias. Entretanto, a substituição da droga por tacrolimo resultou, após 60 dias de terapia, na reversão da perda óssea e, ao final de 120 dias, estes animais possuíam maior volume ósseo e diminuição de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , em comparação aos animais tratados com Ciclosporina.

A ação do tacrolimo sobre o tecido ósseo alveolar foi demonstrada em estudo realizado com animais tratados com a droga durante 60 dias, no qual foi encontrada uma diminuição do número de osteoclastos e a manutenção do número de osteoblastos, levando a um aumento do volume ósseo. Os autores concluíram que o tacrolimo pode levar a um aumento da formação do osso alveolar (Andia et al.<sup>2</sup>, 2008). Estes resultados sugerem que o tacrolimo pode interferir na diferenciação e/ou sobrevivência de osteoclastos na remodelação óssea normal.

Além desse efeito na ausência de inflamação, Guimarães et al. (Guimaraes et al.<sup>19</sup>, 2007) demonstraram que o tacrolimo atuou reduzindo a perda óssea e o infiltrado inflamatório em ratos com doença periodontal induzida por ligadura. Considerando que a maior parte da destruição tecidual associada à doença periodontal é derivada da resposta imune do hospedeiro, estes resultados são consistentes com a função imunossupressora do tacrolimo e com seus efeitos específicos sobre fatores de transcrição NFAT e NF- $\kappa$ B, relevantes para a expressão de diversos genes inflamatórios bem como de RANKL e OPG. O mecanismo segundo o qual tacrolimo inibe a resposta inflamatória e reabsorção óssea não é, contudo, conhecido. Um melhor entendimento destes mecanismos pode proporcionar informações importantes para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para condições inflamatórias associadas à destruição do tecido ósseo, como as doenças periodontais.

Em resumo, considerando que:

- a resposta do hospedeiro, tanto inata quanto adaptativa, tem importante papel na destruição tecidual associada às doenças periodontais;
- RANKL/OPG tem grande relevância no controle da homeostasia do tecido ósseo;
- o entendimento das vias de sinalização intracelular envolvidas tanto na regulação da expressão gênica bem como na atividade biológica de RANKL pode proporcionar informações úteis para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas;
- tacrolimo é uma droga imunossupressora que inibe a proliferação de células T e também modula a atividade de dois fatores de transcrição relevantes para a expressão de diversos genes inflamatórios bem como de RANKL;
- evidências recentes de nosso grupo de pesquisa indicam que tacrolimo reduz o número de osteoclastos e também diminui a severidade da resposta inflamatória e da reabsorção óssea em modelo de doença periodontal experimental;

propusemos os presentes estudos, com objetivo esclarecer se a administração sistêmica de tacrolimo pode modular a expressão gênica de RANKL e OPG na doença periodontal experimental em ratos. Essa

modulação poderia ocorrer por meio direto, atuando na expressão destes genes em macrófagos, osteoblastos e fibroblastos; ou indireto, através da ação sobre as células T, reduzindo seu número e/ou impedindo a produção de determinadas citocinas, as quais induziriam a expressão de RANKL e OPG por diferentes tipos celulares.

A hipótese é que o uso do imunossupressor tacrolimo, como modulador da resposta inflamatória na doença periodontal, poderia atuar também na regulação da reabsorção óssea associada à inflamação. Entre os possíveis mecanismos para esta modulação da atividade de reabsorção óssea por tacrolimo, verificados nos estudos incluídos neste trabalho, incluem modulação da ativação de vias de sinalização envolvidas direta ou indiretamente na expressão de RANKL por células residentes, bem como a redução do número de células T presentes na área (devido à inibição da expressão da IL-2) e, conseqüentemente, diminuição de uma importante fonte de RANKL nos tecidos periodontais inflamados.

PROPOSIÇÃO

## **2. PROPOSIÇÃO**

Os objetivos específicos propostos para esta tese são os seguintes:

- 1) Determinar, *in vitro*, se o tratamento de células residentes do periodonto com tacrolimo (FK-506) modula a expressão gênica de RANKL e OPG induzida por LPS bacteriano e IL-1 $\beta$ ;
- 2) Avaliar os efeitos da administração sistêmica de tacrolimo *in vivo* sobre a presença de linfócitos T (por meio da imunomarcagem para CD3) em dois modelos experimentais na doença periodontal induzida em ratos: colocação de ligadura e injeção de LPS bacteriano;
- 3) Avaliar, em duas linhagens de células T, o efeito do tacrolimo na viabilidade, proliferação celular e ativação das vias de sinalização (p38 e NF-kB) envolvidas na expressão de RANKL e OPG.

# MATERIAL E MÉTODO

### **3. MATERIAL E MÉTODO**

#### ***Animais/Grupos***

Foram utilizados 54 ratos (*Norvergicus albinus*, Wistar) com aproximadamente 5 a 6 semanas, pesando em média 100g. Os animais, em grupos de 5, foram acomodados em gaiolas de polipropileno em condições SPF (*Specific Pathogen Free*) e receberam alimentação granulada (Labina/Purina) e água *ad libitum*, sendo pesados semanalmente para controle do crescimento e desenvolvimento. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da UNICAMP.

A amostra foi aleatoriamente distribuída em três grupos experimentais: controle negativo: animais que não receberam qualquer manipulação, incluindo tratamento com tacrolimo ou indução de doença periodontal; grupo tratamento: animais que foram submetidos à indução de doença periodontal e receberam tacrolimo (1mg/kg), diariamente via intraperitoneal; grupo controle positivo: animais que foram submetidos à indução da doença periodontal, porém receberam como tratamento apenas a injeção de volumes equivalentes do veículo (cloreto de sódio 0.9%) utilizado na diluição de tacrolimo (Tabela 1). A administração de Tacrolimo foi iniciada concomitantemente ao início de indução da doença periodontal experimental (no mesmo dia da instalação das ligaduras e da 1ª injeção de LPS)

**Tabela 1** – Número de animais utilizados e distribuição dos grupos

Grupo	0 dia	5 dias	15 dias	30 dias	Total
Controle (-FK e - DP)	3	5	5	5	18
Animais com DP (-FK)	-	6	6	6	18
Animais com FK (+DP e -DP)	-	6	6	6	18
TOTAL					54

FK significa tratamento com tacrolimo; DP significa indução da doença periodontal

### Indução da Doença Periodontal

Foram utilizados dois protocolos de indução de doença periodontal, sendo estes o uso de ligadura de algodão na mandíbula e a aplicação de lipopolissacarídeos bacterianos na maxila.

Para ambos os protocolos os animais foram submetidos à anestesia geral (0,08 mL de ketamina e 0,04 mL de cloridrato de xilasina por 100g de peso corporal) e posicionados em mesa operatória. Na mandíbula, um fio de algodão número 24 foi colocado ao redor do primeiro molar do lado esquerdo com o objetivo de facilitar o acúmulo de placa bacteriana, permanecendo o molar do lado direito como controle negativo, sem a colocação de ligadura. A ligadura foi mantida pela duração dos períodos experimentais (máximo de 30 dias), sendo sua permanência verificada semanalmente.

Na maxila, para a indução da doença periodontal por lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), foram injetados 3 µL de uma solução de 20µg/µL LPS de *Escherichia coli* (sorotipo 055:B5, Sigma Chem

Co) em tampão fosfato (pH 7,2) na região palatina do 2<sup>o</sup> molar superior direito, num total de 60µg por injeção. Estas injeções foram realizadas 3 vezes por semana, por 4 semanas (total de 12 injeções), com auxílio de microseringas Hamilton e agulhas 33G, sendo os animais previamente sedados. A região palatina superior esquerda de cada animal permaneceu como controle negativo, recebendo injeção do mesmo volume equivalente do veículo de diluição do LPS (tampão fosfato, pH 7,2).

#### **Sacrifício dos animais e obtenção dos espécimes**

Os animais foram sacrificados por meio de asfixia por CO<sub>2</sub> após 5, 15 e 30 dias do início da indução da doença periodontal. Para avaliação de RNA mensageiro (RT-PCR) e análise de expressão em nível protéico (Western Blot e imunohistoquímica), foram obtidas amostras de tecido mole das regiões de indução da doença periodontal e lado contralateral de 4 animais dos grupos controle positivo e tratamento, bem como de 2 animais do grupo controle negativo. As amostras para análise por RT-PCR foram colocadas em TRIzol (Invitrogen Corp.) e as de interesse para Western Blot em RNA Holder (Bio-Rad Laboratories Inc.) e armazenadas em freezer -80C até o momento de sua utilização. O procedimento de preparo e isolamento de RNA e proteína destas amostras está descrito nas seções 'RT-PCR' e 'Western Blot' da Metodologia *in vitro*, respectivamente.

A cronologia do experimento está representada na Tabela 2.

**Tabela 2** – Cronologia do experimento

dias	0	2	4	5	7	9	10	11	14	15	16	18	21	23	25	28	30
Colocação da ligadura	+																
Checagem da ligadura				+			+			+							+
Injeções de LPS	+	+	+		+	+		+	+		+	+	+	+	+	+	
Sacrifício				+						+							+

+ significa que o procedimento foi realizado no período indicado.

- Injeções de LPS foram realizadas 3 vezes/semana, começando no dia 0, durante as 4 semanas. A administração intraperitoneal de tacrolimo (grupo tratamento) e de cloreto de sódio 0,9% (grupo controle positivo) foi efetuada diariamente durante todo o período experimental.

### ***Linhagens celulares***

Linhagens celulares de células osteoblásticas (rato), macrófagos (camundongo), fibroblastos (camundongo) e células T (humano): ROS 17/2.8, RAW264.7, mPDL e Jurkat/Células T ativadas, respectivamente, foram cedidas gentilmente pelo laboratório do Prof. Keith L. Kirkwood (Department of Craniofacial Biology - Medical University of South Carolina, Charleston, SC, USA). Como as células humanas foram obtidas de outro laboratório e representam linhagem celular amplamente utilizada na literatura, não houve necessidade de submeter o protocolo do estudo ao comitê de ética para experimentos em humanos da instituição (Medical University of South Carolina). Estas linhagens são

amplamente utilizadas na literatura, responsivas tanto ao LPS quanto às citocinas inflamatórias.

As linhagens celulares foram mantidas de forma apropriada: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) para ROS/2.8, Raw 264.7 e mPDL, e RPMI 1640 para as células T (Jurkat). O meio de cultura foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) inativado por calor, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL estreptomicina, à 37°C em atmosfera umedecida de ar e 5% de CO<sub>2</sub>.

Previamente ao estímulo com LPS ou com citocinas inflamatórias, as células foram rotineiramente desinduzidas em meio de cultura apropriado suplementado com 0.3% de FBS por um período mínimo de 8 horas. Esta desindução tem a finalidade de evitar possíveis influências de componentes do soro fetal bovino (anticorpos, componentes do sistema complemento) e também proporcionar uma melhor sincronização do ciclo celular. No grupo teste as células foram expostas ao tacrolimo (10µM) 40 minutos antes do estímulo com LPS ou com citocinas inflamatórias.

### ***Proliferação Celular***

Para verificar a influência do tacrolimo na viabilidade e proliferação celular, dois métodos foram utilizados em células Jurkat, mPDL e células T ativadas. O primeiro método utilizado foi através da contagem diferencial em hemocitômetro por meio do ensaio de exclusão

do azul de Trypan para verificar a viabilidade celular. Culturas de mPDL e Jurkat foram cultivadas até alcançar 80% de confluência (como descrito acima) sendo estimuladas com 10 $\mu$ M de tacrolimo pelos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas. Ao término de cada período, alíquotas das culturas foram resuspendidas em solução de azul de Trypan a 0.4% por 5 minutos em temperatura ambiente e então contadas em hemocitômetro. As células coradas em azul foram consideradas inviáveis.

Para a análise dos efeitos de tacrolimo na proliferação celular em termos da modulação das fases do ciclo celular em linfócitos T, foi utilizado um método de incorporação de nucleosídeo durante a síntese ativa de DNA e posterior detecção em citometria de fluxo. Células T ativadas oriundas de células mononucleares do sangue periférico foram utilizadas para este experimento. As células foram estimuladas com tacrolimo (10 $\mu$ M) pelo período de 48 horas. Ao término do período, as células foram preparadas de acordo com instruções do fabricante (Click-iT, Invitrogen Corp.). Brevemente, as células foram marcadas com Edu (5-ethynyl-2'-deoxyuridine), lavadas com BSA 1% (Bovine Serum Albumin) em solução tampão (PBS) e fixadas com Click-iT Fixative. Após 15 minutos, as células foram permeabilizadas, recebendo então um coquetel contendo o fluoróforo AlexaFluor 488 para marcação dos nucleosídeos incorporados ao DNA na fase S do ciclo celular. Após 30 minutos, as células foram avaliadas por citometria de fluxo.

***Reação de transcriptase reversa seguida da reação de polimerase em cadeia (RT-PCR)***

RNA total foi isolado segundo as instruções do fornecedor do reagente (TRIzol, Invitrogen Corp.). Brevemente, os ácidos nucléicos foram separados da fase orgânica com clorofórmio, seguido de precipitação do RNA com isopropanol, lavagem em etanol e eluição em tampão Tris-EDTA pH 7.8. Este mesmo procedimento foi empregado para isolamento de RNA total de amostras de tecido gengival obtidas das regiões de 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> molares superiores e inferiores (utilizando dois animais de cada grupo - controle negativo, controle positivo e grupo teste - tacrolimo - e de cada período - 5, 15 e 30 dias) e também para amostras obtidas das culturas celulares.

Nos experimentos in vitro, as linhagens celulares foram cultivadas até a quase-confluência (80% da área de cultivo) em placas de 100mm de diâmetro, desinduzidas e estimuladas com LPS de *Escherichia coli* (Sigma Chem. Co.) e IL-1 (R&D Systems). As concentrações utilizadas foram de 1 µg/mL (LPS) e 1 ng/mL (IL-1β). A estimulação com as citocinas foi feita 30 a 40 minutos após a adição de 10 µM de tacrolimo ou do volume equivalente do veículo da droga. Os controles negativos dos estímulos também foram realizados com a adição do mesmo volume dos veículos utilizados na diluição das citocinas, e a estimulação foi realizada por um período de 24 horas para possibilitar a avaliação da expressão

gênica no estado de equilíbrio entre a transcrição e degradação do RNAm ('steady-state').

A pureza e concentração das amostras de RNA total assim isoladas foram determinadas em espectrofotômetro, respectivamente, pelo valor da relação entre as absorvâncias a 260 e 280 nm, e pelo valor da absorvância a 260 nm. A síntese de cDNA (complementary DNA) foi realizada subsequentemente utilizando 500ng de RNA total e 200 unidades da enzima de transcriptase reversa na presença de Oligo-dT (12-18) primers, dNTPs e MgCl<sub>2</sub>, segundo as instruções do fabricante (Invitrogen Corp.).

A reação de PCR foi feita num volume total de 25 µL, utilizando 2 µL do produto da reação de transcriptase reversa na presença de 100 pmol/µL de primers de cada gene (50 pmol/µL de cada primer, *sense* e *antisense*). A sequência dos primers e informações sobre as condições da reação de PCR são apresentadas na Tabela 3. Os produtos da reação de PCR foram resolvidos por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). Para documentação e análise, foram obtidas imagens digitalizadas destes géis, as quais foram submetidas à análise densitométrica (Quantity One, Bio-Rad®). A expressão dos genes-alvo foi normalizada para a expressão do *housekeeping gene* (Gliceraldeído fosfato desidrogenase, GAPDH) e expressas como *fold-change* em relação ao controle negativo.

**Tabela 3** – Seqüência dos primers e condições iniciais da reação de PCR.

Gene	Primers (5' – 3') sense (S) e antisense (AS)	Acession#	Ta (°C)	Amplicon	Ciclos
<i>GAPDH</i>	CACCATGGAGAAGGCCGGGG – S GACGGACACATTGGGGGTAG – AS	BC083065	52	418 bp	30
<i>mRANKL</i>	CAGCACTCACTGCTTTTATAGAATCC – S AGCTGAAGATAGTCTGTAGGTACGC – AS	NM011613	56	462 bp	30
<i>mOPG</i>	ACCTCACCACAGAGCAGCTT – S TTGTGAAGCTGTGCAGGAAC – AS	NM008764	56	264 bp	30
<i>rRANKL</i>	TCGGGTTCCCATAAAGTCAG – S CTGAAGCAAATGTTGGCGTA – AS	NM057149	58	140 bp	32
<i>rOPG</i>	CACTGCACAGTCAGGAGGAA – S TGCTTTCGATGACGTCTCAC – AS	NM012870	56	318 bp	32

**Western Blot**

As células foram cultivadas em placas de cultura de 35 mm de diâmetro até atingirem 80% de confluência, desinduzidas em meio de cultura contendo 0.3% de FBS por um período mínimo de 8 horas e estimuladas por LPS, IL-1 $\beta$  e IL-2 com ou sem tratamento prévio com 10  $\mu$ M de tacrolimo. Para avaliação da expressão de RANKL (# sc-7627, Santa Cruz Biotechnology) e OPG (# sc-21038, Santa Cruz Biotechnology), o estímulo foi mantido por 24 horas, enquanto para determinação da ativação de NF-kB (#3037, Cell Signaling Technology), Phospho-p38 (#9216, Cell Signaling Technology), Phospho-STAT3 (#9134, Cell Signaling Technology) e Phospho-STAT5 (#9359, Cell Signaling Technology), a incubação foi realizada por 0, 15, 30 e 60 minutos.

Após o período de incubação, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS), resfriado a 4°C, e adicionadas a 100 µL de tampão para extração de proteínas acrescido de inibidor de protease (M-PER – PIERCE®; Complete™ - Santa Cruz Biotechnology). Após 5 minutos, as placas foram raspadas para coleta do material em tubos plásticos de 1,5 mL. Após centrifugação (7 minutos, 12.000 rpm a 4°C), o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e foi realizada a quantificação das proteínas. A concentração de proteína total nas amostras foi determinada pelo método de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Trinta microgramas de cada amostra foram submetidos à eletroforese vertical em gel de acrilamida 10% (100V – 50 minutos) e subsequentemente eletrotransferidos (300mA – 60 minutos) para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Após o bloqueio em tampão Tris-NaCl (TBS) contendo 5% de leite desnatado liofilizado, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários para as proteínas de interesse (RANKL, formas fosforiladas de NF-κB, STAT3, STAT 5 e p38) por 18h ('overnight') com suave agitação a 4°C. Cada membrana foi reutilizada até três vezes, com a remoção dos anticorpos primários e secundários por meio de um procedimento de 'stripping'. Brevemente, as membranas foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e com suave agitação em tampão contendo 150 mM Tris, 1% SDS e 20 mM de β-mercaptoetanol. A detecção da presença das proteínas foi feita por um sistema de quimioluminescência (LumiGlo,

Cell Signaling®). Filmes radiográficos expostos às membranas foram processados e digitalizados. As imagens obtidas foram submetidas à análise densitométrica (Quantity One, Bio-Rad®).

### **Análise por imunohistoquímica**

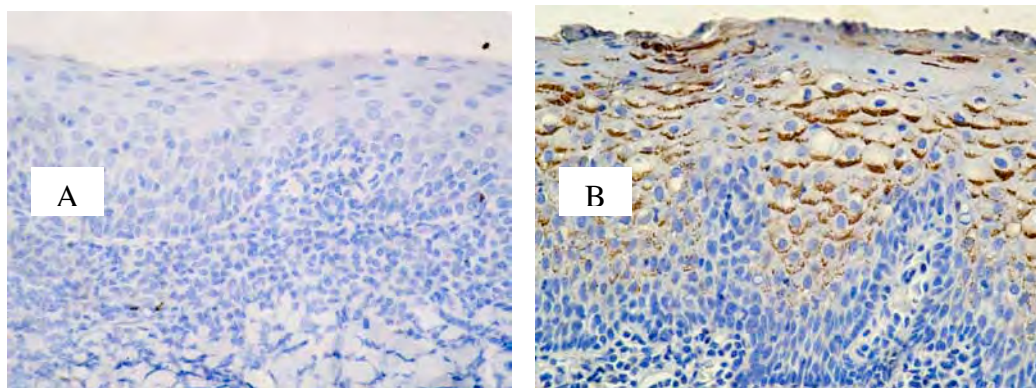
Para avaliação por imunohistoquímica, peças dos maxilares superiores e inferiores de 5 animais de cada período (5, 15 e 30 dias) e grupo experimental (controle positivo e tratamento), incluindo 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> molares, foram removidas e separadas em lados direito e esquerdo, sendo então imersas em formol tamponado a 10% para fixação por 48h. Peças de 2 animais do grupo controle não tratado (controle negativo) também foram obtidas de forma similar. As peças foram desmineralizadas em solução de EDTA (0.5M, pH 8.0) sob agitação, à temperatura ambiente, durante 2 a 3 meses (com troca da solução 2x por semana) e posterior inclusão em parafina.

Para detecção e localização da expressão de RANKL por imunohistoquímica, foi utilizado o método do complexo streptavidina-biotina-peroxidase (LSAB), com a utilização do kit LSAB + System HRP (DAKO Cytomation), segundo as instruções do fabricante.

Após inclusão em blocos de parafina, foram realizados cortes semi-seriados de 5 µm de espessura, montados em lâminas com superfície de vidro silanizada (DAKO Cytomation) e levados à estufa a 58°C por 2 horas. No momento da realização da imunohistoquímica, as

lâminas foram tratadas com xilol (5 minutos, 3x) para remoção da parafina, lavadas com álcool absoluto e rehidratadas gradualmente.

Como controles positivos foram utilizados cortes de amígdala humana, por representarem um controle positivo adequado segundo o fornecedor do anticorpo primário, enquanto os controles negativos foram obtidos apenas com a omissão do anticorpo primário (Figura 4).



**FIGURA 4** – Otimização das condições para marcação de RANKL em cortes histológicos de amígdala humana (controle positivo). Em (A) o controle negativo, representado pela omissão do anticorpo primário e em (B) a marcação para RANKL. Anticorpo primário diluído a 1:250. Os cortes foram corados com eosina para evidenciação dos núcleos celulares.

Após a desparafinização e a hidratação dos cortes, as lâminas foram incubadas em peróxido de hidrogênio 0,3% diluído em metanol por 30 minutos para eliminar atividade de peroxidase endógena. O bloqueio de ligações não específicas foi feito em tampão (0.1% Triton X-100, 0.05% Tween-20, 0.05% sodium azide, 0.01M PBS pH 7.2) contendo 2% de albumina sérica bovina e 2% de soro da mesma espécie

animal em que foram produzidos os anticorpos secundários. A incubação com os anticorpos primários policlonais para RANKL, na diluição de 1:250 em PBS/BSA à 1% (# sc-7628, Santa Cruz Biotechnology), foi feita por 18h (overnight) à 4°C.

Após repetidas lavagens das peças em PBS, os cortes foram incubados com IgG conjugada à biotina por 30 minutos, seguido de incubação por 30 minutos com streptavidina-*horseradish peroxidase*. O substrato 3,3'-diaminobenzidina foi aplicado após repetidas lavagens dos cortes em PBS. Como controle negativo, os anticorpos primários foram omitidos e/ou substituídos por soro não-imune. Os cortes foram corados com hematoxilina para visualização dos núcleos.

A mesma seqüência para RANKL foi utilizada para a detecção e localização da marcação para CD3 (#550295, BD Pharmingen) nas amostras, porém utilizando diluição de 1:100 e o mesmo período de incubação.

Todas as imagens foram digitalizadas e avaliadas por 2 examinadores independentes. A calibração foi realizada comparando as imagens em um escore padrão contendo fotos representativas das intensidades 1 (0%), 2 (1%-30%), 3 (31%-60%) e 4 (61%-100%) de marcação.

### **Análise Estatística**

Para a realização da análise estatística, utilizou-se *test-t de Student* para comparações entre dois grupos (grupo tacrolimo versus grupo controle) ou ANOVA, para comparações entre diferentes grupos tratados e controle (três ou mais comparações). O nível de significância foi estabelecido em 95% ( $p < 0.05$ ). Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

RESULTADO

## **4. RESULTADO**

### CAPÍTULO 1

“FK-506 inhibits LPS- and IL-1-induced RANKL expression by periodontal fibroblasts”.

Autores: Rafael Sartori, Morgana R. Guimarães, Silvana R. Orrico, Carlos Rossa Junior

Enviado para publicação: Inflammation Research - ISSN:1023-3830  
(05/02/2010)

### CAPÍTULO 2

“Systemic administration of FK-506 decreases CD3-positive cells in ligature-induced periodontal disease model in rats.”

Artigo a ser submetido na Archives of Oral Biology

### OUTROS RESULTADOS

## CAPÍTULO 1

“FK-506 inhibits LPS- and IL-1-induced RANKL expression by periodontal fibroblasts”

Authors: Rafael Sartori<sup>1</sup>, Morgana R. Guimarães<sup>1</sup>, Silvana R. Orrico<sup>1</sup>,  
Carlos Rossa Junior<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Periodontics, School of Dentistry at Araraquara, Sao Paulo State University (UNESP), Araraquara, Sao Paulo, Brazil

Running head: FK-506 inhibits LPS- and IL-1-induced RANKL

Keywords: FK-506, RANKL, OPG, bone resorption, fibroblast.

Corresponding Author: Carlos Rossa Jr, DDS, PhD  
Department of Diagnosis and Surgery  
School of Dentistry at Araraquara – UNESP  
Rua Humaitá, 1680  
CEP 14801-903 Araraquara/SP - BRAZIL  
Phone: (55) 16 3301 6375  
Fax: (55) 16 3301 6369  
e-mail: crossajr@foar.unesp.br

## ABSTRACT

Fibroblasts are the most abundant cell type in the periodontal tissues and present a crucial role on physiologic and pathologic tissue turnover by producing various cytokines and extracellular matrix proteins. We have previously shown that fibroblasts from periodontal tissues express RANKL upon inflammatory cytokine and bacterial LPS stimulation. FK-506 is an immunosuppressive drug used to prevent graft rejection by affecting T lymphocytes activation through modulation of  $Ca^{+2}$  signaling. Previous findings from our research group indicated that administration of FK-506 decreased bone loss in a periodontal disease model in rats; the purpose of this study was to evaluate the effect of FK-506 on LPS- and IL-1-induced expression of RANKL in fibroblasts. Materials: Mouse periodontal ligament cells (mPDL) were plated at  $1.5 \times 10^5$  cells/ml in 65mm plates. These cells were stimulated with IL-1 $\beta$  (1ng/ml) or E. coli LPS (1ug/ml). In the test group FK-506 (10uM) was added 40 minutes prior to the stimulation with IL-1 $\beta$  or LPS. Total RNA and protein were harvested after 24 hours. RT-PCR and Western Blot analysis were performed. Results: Induction of RANKL mRNA and protein in mPDL by LPS or IL-1 $\beta$  treatment was completely blocked by FK-506. Conclusion: The FK-506 inhibits RANKL expression by fibroblasts from periodontal tissues.

## INTRODUCTION

The ratio between RANKL and OPG is the current paradigm for modulation of coupled bone turnover and, specifically in periodontal disease, this concept is supported by observations demonstrating that patients with advanced periodontitis present higher levels of RANKL and lower levels of OPG than periodontally healthy patients [1].

FK-506 is an immunosuppressive drug used to reduce the risk of organ transplant rejections. It has similar properties to Cyclosporin, but with less adverse reactions and significantly greater potency [2]. Some animal and clinical studies reported that administration of FK-506 resulted in improved bone turnover in rheumatoid arthritis (RA) [3]. Patients with rheumatoid arthritis that have received FK-506 showed less bone resorption and osteopenia [4-6]. In rat bone marrow cells, treatment with FK-506 increased alkaline phosphatase activity, suggesting induction of bone calcification [7]. However, there is paucity of information on the effects of FK-506 on the expression of OPG and RANKL, which are cytokines with a direct and profound effect on bone turnover.

Recently, our research group showed that animals with experimental periodontitis treated with FK-506 exhibited less bone resorption and inflammatory infiltrate when compared to vehicle-treated animals [8], suggesting that FK-506 has an effect on bone turnover and inflammatory response also in periodontal disease.

The primary source of RANKL in periodontal tissues has been considered by some to be T cells [9-11] are the primary targets of FK-506. However, there is evidence [12] indicating that bone loss can occur even in the absence of T cells; suggesting a role for resident cells participating in the innate immune response, such as fibroblasts, osteoblasts and macrophages. Indeed, our research group and others have shown that periodontal fibroblasts and osteoblasts can have an important role in bone turnover due to their capacity to express OPG and RANKL. The mRNA expression of these genes is affected by bacterial lipopolysaccharide (LPS), IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 [13-17].

Based on these observations, this study was undertaken to evaluate the effects of FK-506 on RANKL and OPG expression induced by bacterial LPS and IL-1 $\beta$  in periodontal fibroblastic cells.

## MATERIAL AND METHODS

### Cell Culture and Reagents

SV-40 large T-antigen immortalized mouse periodontal ligament cells (mPDL) were obtained from Dr. Martha Somerman (University of Washington, Seattle, WA) and cultured with DMEM medium supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, 100 IU/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. rhIL-1 $\beta$  from R&D Systems, *E. coli* (serotype 0127:B8) LPS from Sigma Chem. Co., FK-506 from Cilag-Jansen. Primary and secondary antibodies were from Cell Signaling

and Santa Cruz Biotechnology. RT-PCR reagents were from Invitrogen and Promega.

#### Sample preparation

Cells were plated at  $1.5 \times 10^5$  cells/ml in 60 mm tissue culture dishes and cultivated until 80% confluency was achieved, when they were deinduced by changing the growth medium to DMEM supplemented with 0.3% FBS for 8 h. rhIL-1 $\beta$  (1ng/ml), *E. coli* LPS (1ug/ml) or the same volume of PBS/BSA vehicle were added to the culture medium. In the FK-treated samples 10  $\mu$ M of FK-506 was added 40 minutes prior to stimulation with rhIL-1 $\beta$  or LPS, whereas control samples received the same volume of the vehicle used to dilute FK-506. Total RNA and protein were harvested after 24 hours.

#### Extraction of total RNA and RT-PCR

Total RNA was extracted from cells using Trizol (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. cDNA was obtained by reverse transcription of 500ng of total RNA according to the manufacturer's protocol (Superscript III, Invitrogen). PCR (GoTaq Flexi, Promega) was performed using the following primer pairs: mRANKL (5'-CAGCACTCACTGCTTTTATAGAATCC-3';  
5'AGCTGAAGATAGTCTGTAGGTACGC-3', accession# NM011613),  
OPG (5'-ACCTCACCACAGAGCAGCTT-3', 5'-

TTGTGAAGCTGTGCAGGAAC-3', accession# NM008764), and GAPDH (5'-CACCATGGAGAAGGCCGGGG-3', 5'-GACGGACACATTGGGGGTAG-3', accession# BC083065). The amplification protocol consisted of an initial denaturation at 94°C for 2min, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 60s, annealing at 56°C for 60s (GAPDH 52°C), and extension at 72°C for 60s. The final extension was performed at 72°C for 10 minutes. The PCR products were subjected to electrophoresis at constant 80 mV for 50 minutes on 1.5% agarose gels containing 0.5 ug/mL of ethidium bromide. Digital images of the gels under UV light were obtained and quantitated by densitometry using QuantityOne software (BioRad). The density of the bands for RANKL and OPG were normalized by the density of the bands representing housekeeping gene GAPDH and expressed as fold change over unstimulated control.

#### Immunoblot analysis

Total protein (cell lysates) was harvested using M-PER (Pierce) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Complete™ - Santa Cruz Biotechnology), except for the evaluation of OPG expression when the cell culture supernatants were concentrated with centrifugal filter with a nominal molecular weight cut-off of 10 KDa (Microcon, Millipore Corp). A total of 40µg of protein were subjected to 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and electrophoretically transferred to a

nitrocellulose membrane (BioRad®) using constant current of 32 mA for 1 hour. After blocking of non-specific binding with 5% non-fat dry milk in TBS-T for 1 hour at room temperature, the membranes were washed 3 times (15 min each) in 0.01% TBS-T and then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies against RANKL (cat# sc-7628 - Santa Cruz Biotechnology) or OPG (cat# sc-11383, Cell Signaling Technology). GAPDH expression levels were also detected (cat# sc-25778, Cell Signaling Technology) and used to normalize the expression of RANKL and OPG. The membranes were washed again in TBS-T and incubated with HRP-conjugated secondary antibody for 60 minutes at room temperature. After repeated washing in TBS-T, detection of the immunocomplexes on the membrane was made using enhanced chemiluminescence reagents (Super Signal West Pico®, Thermo Scientific) and detected by exposure of radiographic films to the membrane. Digital images of the radiographic films were obtained in a gel documentation system (ImageQuant, GE Healthcare) and subjected to densitometric analysis using ImageQuant software (GE Healthcare).

#### Data Analysis

All densitometric data are expressed as mean±s.e.m. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test (for comparisons between the same stimulation between FK506-treated and vehicle-treated groups) or ANOVA (for comparisons among different stimulations in each group,

FK-506-treated or vehicle-treated). Significance level was set to 95% ( $p < 0.05$ ). Results are representative of at least three independent experiments.

## RESULTS

### *FK-506 completely blocks IL-1 and LPS- induced RANKL and OPG mRNA expression by periodontal fibroblasts*

Either IL-1 or LPS induced a significant increase on expression of RANKL mRNA whereas OPG mRNA levels were not significantly increased. Treatment with FK-506 before IL-1 ( $p = 0.0116$ ) or LPS ( $p = 0.0158$ ) stimulation resulted in complete abrogation of RANKL mRNA induction in periodontal fibroblasts. IL-1 ( $p = 0.02509$ ) and especially LPS-induced ( $p = 0.0030$ ) OPG mRNA was also inhibited by FK506. The OPG/RANKL expression ratio was decreased after IL-1 or LPS stimulation, indicating a net change towards bone resorption; however this trend was reversed when FK-506 was added to the cells before IL-1 or LPS stimulation.

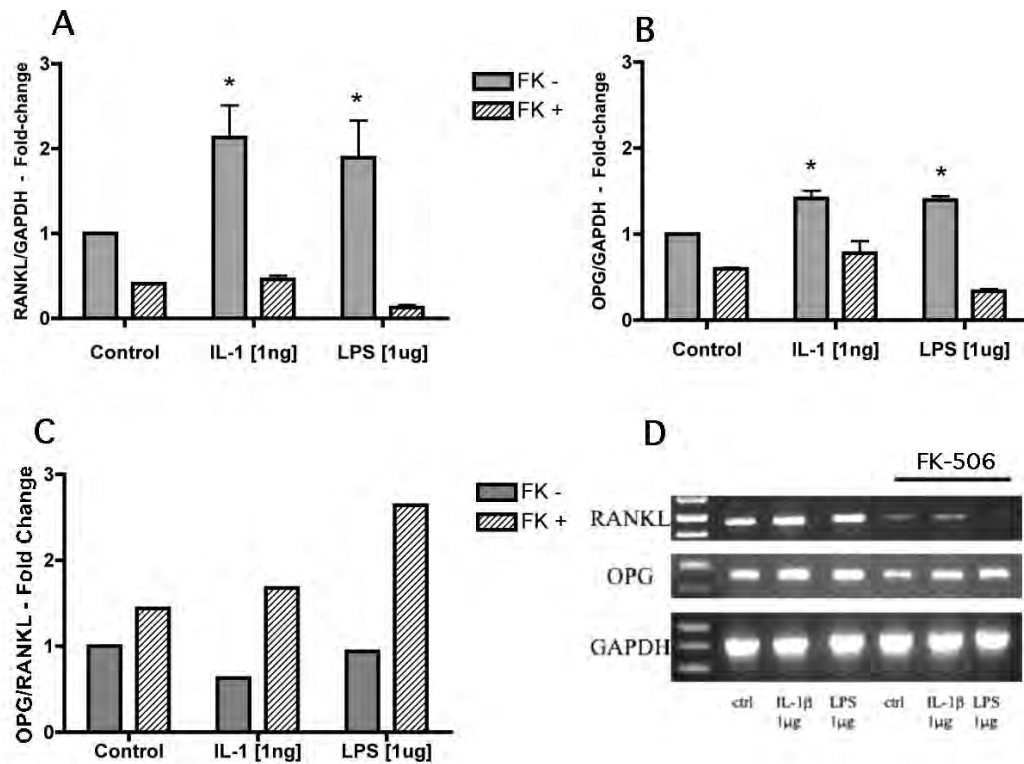


Figure 1 – FK-506 inhibits IL-1 and LPS-induced increase of RANKL mRNA in periodontal fibroblasts. Reverse transcription-polymerase chain reaction shows that RANKL mRNA expression induced by LPS or IL-1 is increased after 24h (A), whereas OPG mRNA was not significantly increased by these stimuli (B). The asterisks indicate that pre-treatment of the cells with 10  $\mu$ M of FK-506 resulted in significant decrease on both RANKL and OPG mRNA ( $p < 0.05$ ) after LPS and IL-1 stimulation. OPG/RANKL expression ratio (C) decreased when the cells were stimulated with either LPS or IL-1, reflecting the increase on RANKL mRNA. This situation is reversed when cells were treated with FK-506 previously to the stimulation with IL-1 or LPS. (D) Representative images of the RT-PCR for RANKL, OPG, and GAPDH mRNA. Results from three independent experiments. \* indicates statistically difference ( $p < 0.05$ ) between FK- cells and FK+ cells.

*FK-506 suppresses both IL-1- and LPS-induced RANKL and OPG protein expression*

Regulation of gene expression observed at the mRNA level was also observed at the protein level. A significant decrease in RANKL protein expression was observed when cells were treated with FK-506 before IL-1 ( $p=0.0185$ ) or LPS ( $p=0.0329$ ) stimulation. FK-506 also decreased OPG protein expression, but not significantly. These results suggest the absence of post-transcriptional mechanisms for the regulation of these genes in response to LPS and IL-1 $\beta$  in periodontal fibroblasts.

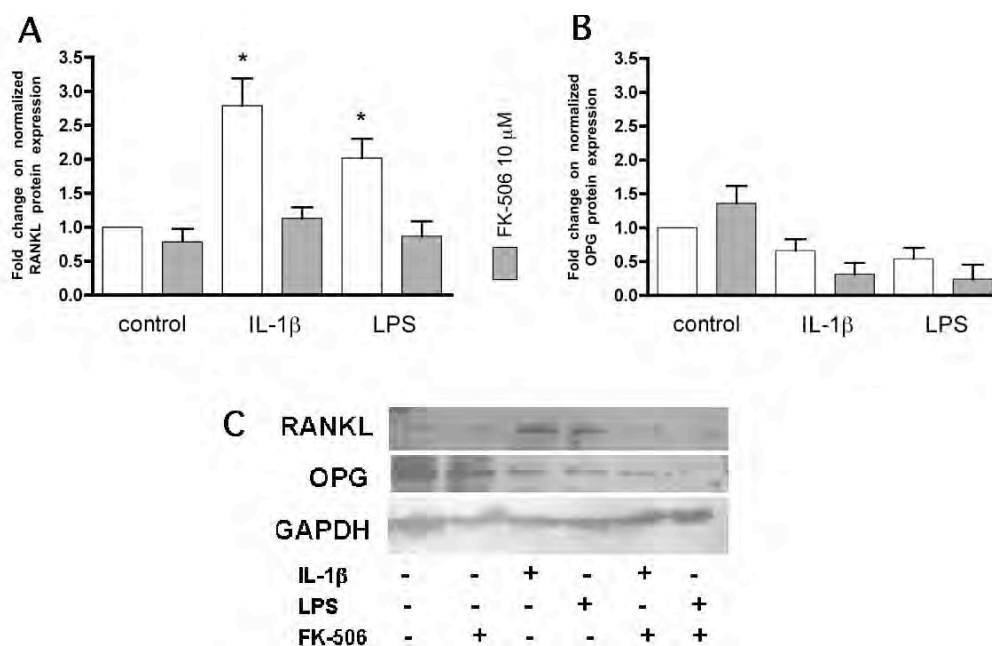


Figure 2 – FK-506 also inhibits IL-1- and LPS-induced RANKL protein expression by periodontal fibroblasts. Pre-treatment of the cells with FK-506 [10 $\mu$ M] attenuates LPS- and IL-1-induced RANKL (A) and OPG (B) protein expression. The mPDL cells were treated with 10 $\mu$ M FK-506 or the vehicle and then stimulated with 1 $\mu$ g of LPS or 1ng.mL of IL-1 for 24 h. The control group only received the vehicle used to dilute IL-1 and LPS. Forty micrograms of total protein harvested from cell lysates were separated by SDS-PAGE electrophoresis. RANKL and GAPDH polyclonal

antibodies were used to detect the proteins on cell lysates. OPG protein was detected on cell culture supernatants harvested from the same cultures. LPS- and IL-1-induced RANKL expression was increased after 24h when compared with control cells but attenuated when the cells were treated previously with FK-506 (IL-1  $p=0.0185$ ; LPS  $p=0.0329$ ). FK-506 also inhibited OPG protein expression induced by these stimuli, but not significantly (IL-1  $p=0.2138$ ; LPS  $p=0.3245$ ). Figure is representative of three independent experiments (C), and bar graphs indicate mean  $\pm$  SD of the densitometric measurements of these experiments. (\* $p<0.05$ , one sample *t*-test).

## DISCUSSION

We show that FK-506 completely suppresses LPS- and rhIL-1 $\beta$ -induced RANKL in periodontal ligament fibroblasts. OPG expression was only slightly inhibited by FK-506; and the net result of these effects is indicated by the increase on the OPG:RANKL ratio, which in vivo could represent a shift of the bone turnover towards bone formation. To our knowledge, this is the first demonstration of an effect of FK-506 on RANKL expression in periodontal fibroblasts. Fibroblasts are the most abundant cell type in periodontium and they can play important roles on tissue homeostasis, including RANKL expression.

These results agree with the previous observations in vivo [8]. This effect on resident cells suggest that FK-506 could affect bone resorption by two possible mechanisms: 1) directly, by modulating RANKL/OPG expression by these cells; 2) indirectly, by altering inflammatory cytokine production by these resident cells participating in the innate immune response which ultimately would affect activation of B and T cells [18]. Our

results suggest that the effects of FK-506 on resident cells, such as periodontal fibroblasts, may have important implications in the bone resorption associated with periodontal disease; however given the evidence for the crucial role of T cells in periodontal diseases [11] and considering that these cells are the primary target of FK-506, we intend to address the influence of FK-506 on T cells present in periodontal lesions.

FK-506 could also affect RANKL expression indirectly, by modulating the expression of inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6, which may feedback on the cells and induce RANKL expression on resident and non-resident cells at the inflammation site [13] and this is another mechanism that we will explore in future studies. Many studies use Interleukin-1 (IL-1) and/or bacterial lipopolysaccharide (LPS) as extracellular stimulus to induce inflammatory cytokine production. These stimuli will interact with their own membrane-bound receptor to initiate intracellular signaling by different pathways, such as nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and MAP Kinase pathways, including ERK, JNK and p38 pathways. The activation of these intracellular proteins will modulate expression of inflammatory cytokines as TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-6 [17, 19]. Inhibitors of NF- $\kappa$ B activation or p38 MAP Kinase have been shown to suppress LPS-induced inflammatory gene expression [20, 21]. Thus, inhibition of NF- $\kappa$ B by FK-506 can result in modulation of various inflammatory mediators, including RANKL shown in our study, and not only affecting the expression of its classical target, IL-2.

FK-506 also influenced OPG expression decreasing both mRNA and protein expression, but only the mRNA was significantly decreased, further suggesting a bone protective role for FK-506. The lack of consistent regulation of OPG was not surprising, considering reports indicating that OPG gene regulation is complex, with a number of other non-inflammatory biological mediators involved in its expression, including TGF- $\beta$ , PTH, glucocorticoids, and estrogen [22-24].

Elucidation of the specific effects of FK-506 on RANKL expression by fibroblasts and other cell types can provide important information regarding the role of FK-506 on bone tissue and can also give insights to the development of new drugs and/or strategies for the modulation of coupled bone turnover in inflammatory/infectious conditions such as periodontal disease.

## CONCLUSION

FK506 completely suppresses IL-1- and LPS-induced expression of RANKL but not significantly OPG by periodontal fibroblasts. These changes result in a net change of the RANKL/OPG ratio that is consistent with decrease on bone resorptive activity.

## SUPPORT

This study was supported by FAPESP (The State of Sao Paulo Research Foundation) Grant #05/04428-9, Sao Paulo, Sao Paulo State, and CNPq

(National Council for Scientific and Technological Development), Brasilia, DC.

## REFERENCES

1. Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Huang L, Pavlos NJ, Rogers M, et al. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med* 2003; 11:17-21.
2. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo)* 1987; 40:1256-65.
3. Miyata S, Ohkubo Y, Mutoh S. A review of the action of tacrolimus (FK506) on experimental models of rheumatoid arthritis. *Inflamm Res* 2005; 54:1-9.
4. Goffin E, Devogelaer JP, Lalaoui A, Depresseux G, De Naeyer P, Squifflet JP, et al. Tacrolimus and low-dose steroid immunosuppression preserves bone mass after renal transplantation. *Transpl Int* 2002; 15:73-80.
5. Scolapio JS, DeArment J, Hurley DL, Romano M, Harnois D, Weigand SD. Influence of tacrolimus and short-duration prednisone on bone mineral density following liver transplantation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2003; 27:427-32.
6. Smallwood GA, Burns D, Fasola CG, Steiber AC, Heffron TG. Relationship between immunosuppression and osteoporosis in an outpatient liver transplant clinic. *Transplant Proc* 2005; 37:1910-1.
7. Yoshikawa T, Nakajima H, Uemura T, Kasai T, Enomoto Y, Tamura T, et al. In vitro bone formation induced by immunosuppressive agent tacrolimus hydrate (FK506). *Tissue Eng* 2005; 11:609-17.
8. Guimaraes MR, Nassar PO, Andia DC, Nassar CA, Spolidorio DM, Rossa C, Jr., et al. Protective effects of Tacrolimus, a calcineurin inhibitor, in experimental periodontitis in rats. *Arch Oral Biol* 2007; 52:882-8.
9. Taubman MA, Kawai T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001; 12:125-35.
10. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol* 2005; 76:2033-41.
11. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol* 2006; 169:987-98.
12. Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC. CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun* 1999; 67:2804-9.

13. Fukushima H, Jimi E, Okamoto F, Motokawa W, Okabe K. IL-1-induced receptor activator of NF-kappa B ligand in human periodontal ligament cells involves ERK-dependent PGE2 production. *Bone* 2005; 36:267-75.
14. Kikuchi T, Matsuguchi T, Tsuboi N, Mitani A, Tanaka S, Matsuoka M, et al. Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. *J Immunol* 2001; 166:3574-9.
15. Rossa C, Ehmann K, Liu M, Patil C, Kirkwood KL. MKK3/6-p38 MAPK signaling is required for IL-1beta and TNF-alpha-induced RANKL expression in bone marrow stromal cells. *J Interferon Cytokine Res* 2006; 26:719-29.
16. Wada N, Maeda H, Yoshimine Y, Akamine A. Lipopolysaccharide stimulates expression of osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappa B ligand in periodontal ligament fibroblasts through the induction of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *Bone* 2004; 35:629-35.
17. Rossa C, Jr., Liu M, Kirkwood KL. A dominant function of p38 mitogen-activated protein kinase signaling in receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression and osteoclastogenesis induction by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J Periodontal Res* 2008; 43:201-11.
18. Sakuma S, Kato Y, Nishigaki F, Magari K, Miyata S, Ohkubo Y, et al. Effects of FK506 and other immunosuppressive anti-rheumatic agents on T cell activation mediated IL-6 and IgM production in vitro. *Int Immunopharmacol* 2001; 1:749-57.
19. Okahashi N, Inaba H, Nakagawa I, Yamamura T, Kuboniwa M, Nakayama K, et al. *Porphyromonas gingivalis* induces receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblasts through the activator protein 1 pathway. *Infect Immun* 2004; 72:1706-14.
20. Aikawa Y, Yamamoto M, Yamamoto T, Morimoto K, Tanaka K. An anti-rheumatic agent T-614 inhibits NF-kappaB activation in LPS- and TNF-alpha-stimulated THP-1 cells without interfering with IkappaBalpha degradation. *Inflamm Res* 2002; 51:188-94.
21. Kirkwood KL, Li F, Rogers JE, Otremba J, Coatney DD, Kreider JM, et al. A p38alpha selective mitogen-activated protein kinase inhibitor prevents periodontal bone loss. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 320:56-63.
22. Karst M, Gorny G, Galvin RJ, Oursler MJ. Roles of stromal cell RANKL, OPG, and M-CSF expression in biphasic TGF-beta regulation of osteoclast differentiation. *J Cell Physiol* 2004; 200:99-106.
23. Liang L, Yu JF, Wang Y, Ding Y. Estrogen regulates expression of osteoprotegerin and RANKL in human periodontal ligament cells through estrogen receptor beta. *J Periodontol* 2008; 79:1745-51.
24. Lossdorfer S, Gotz W, Jager A. PTH(1-34) affects osteoprotegerin production in human PDL cells in vitro. *J Dent Res* 2005; 84:634-8.

## CAPÍTULO 2

“Systemic administration of FK-506 decreases CD3-positive cells in ligature-induced periodontal disease model in rats.”

### ABSTRACT

Periodontal diseases are characterized by an inflammatory response triggered by bacteria in dental plaque that can lead soft tissue destruction and bone resorption. Tissue destruction is largely due to the host response elicited by bacterial antigens; and T cells are thought to play a fundamental role in this process. FK-506 is an immunosuppressive drug used to prevent graft rejection by affecting recruitment and activation of T lymphocytes through modulation of Ca<sup>2+</sup> signaling. Previous findings from our research group indicated that administration of FK-506 decreased bone loss in an experimental periodontal disease model in rats; the purpose of this study was to evaluate the effect of FK-506 on T cells both in vitro and in vivo. Materials: Jurkat cells or T cells from PBMC were used for in vitro proliferation experiments using FK-506 [10uM] or vehicle prior to treatment with IL-2. Two models of experimental periodontal disease in

rats were used: LPS- and Ligature-induced model. The test group received FK-506 daily by intraperitoneal injections and the presence of CD3-positive cells in the periodontal tissues was evaluated by immunohistochemistry. Control group received daily injections of the vehicle. Results: FK-506 significantly reduced proliferation of both Jurkat cells and T cells from PBMC. In vivo, the tissues of FK-506-treated animals showed significantly less CD3 staining than those of the control animals in both experimental models used. Conclusion: FK-506 suppresses T cell proliferation and affects T cell recruitment on experimental periodontal disease models.

## INTRODUCTION

Periodontal disease is an inflammatory response to the bacteria in dental plaque that leads soft tissue destruction and bone resorption in advanced cases. The disease progression is due to a combination of factors including presence of periodontopathogenic bacteria, high levels of proinflammatory cytokines, and host cells that can limit the extension of lesion [1]. Among these host immune cells, T lymphocytes are considered to play a major role on the orchestration of the immune response and, especially, on the control of bone turnover. Positive correlation between the occurrence of disease and elevated serum antibody response to the oral bacteria suggests the involvement of an adaptive immune response in the onset and development of periodontal disease. B and T cells are thought to have major roles on periodontal disease and some authors suggest that these cells represent the primary sources of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) in periodontitis active sites [2]. This implies that B and T cells have a prominent role on bone resorption associated with periodontal disease, since RANKL is required for osteoclast differentiation, activation and survival.

FK-506 is a macrolide immunosuppressant drug isolated from *Streptomyces tsukubaensis* [3, 4], widely used to reduce the risk of organ transplant rejections. FK-506 exerts its immunosuppressive effects

primarily by interfering with the activation of T cells and blocking the production of T cell-derived cytokines. FK-506 binds to intracellular proteins forming FKBP complex that suppress calcineurin phosphatase, an enzyme involved in activation of the nuclear factor of activated T Cells (NFAT), a transcription factor required for the expression of cytokine genes by T cells [5, 6]. T cells have been considered to play a fundamental role on periodontal disease since they express a variety of cytokines that have been recognized as key regulators of bone turnover and inflammation [2, 7, 8].

Recently, our group showed that animals with experimental periodontitis treated with FK-506 exhibited less bone resorption and decreased severity of inflammatory infiltrate when compared to vehicle-treated animals [9]; suggesting that FK-506 has effect on bone turnover, cell recruitment and inflammatory response in periodontal disease. Based on these observations this study was undertaken to evaluate effects of FK-506 on T cells in vivo and in vitro, assessing proliferation, viability, and LPS-induced activation of intracellular signaling pathways that are relevant for the expression of inflammatory genes, including IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  and RANKL, as well as of molecules involved in the immune response and inflammation, such as chemokines, metalloproteinases and prostaglandins [10].

## MATERIAL AND METHODS

### Materials

### Animals

Twelve adult male *Rattus norvegicus albinus* rats were housed under specific pathogen-free conditions with food and tap water ad libitum at the animal facility of the Department of Microbiology and Immunology, Biology Institute – State University of Campinas (IB-UNICAMP). Once weekly, animals were weighed to ensure proper growth and nutrition. All protocols were approved by the Animal Experiments Ethics Committee — UNICAMP (CEEA).

### Periodontal disease models

Two experimental models of periodontal disease were used: ligature-induced periodontal disease at the lower left first molars and LPS injections at the palatal aspect of the upper right first molars of the same animals. The contralateral sides in each arch of the same animals were used as sham-controls: no ligatures were placed on the lower right molars and only the same volume of vehicle (PBS, pH 7.4) was injected on the palatal aspect of the upper left first molars. The LPS side (n=12) received a 3  $\mu$ L injection of a 10  $\mu$ g/ $\mu$ l PBS suspension of *E. coli* LPS (strain 055:B5, Sigma-Aldrich Chemical Co.) with a 33-gauge Hamilton syringe to

the palatal interproximal gingivae at the mesial aspect of the first molars. Injections were performed 2 times per week (starting on day 1, then day 4, and every three days thereafter until the end of the 30 day experimental period). This protocol is from a previous publication from our group [11]. At the end of 30<sup>th</sup> day, all animals were sacrificed by carbon dioxide asphyxiation. Maxillae and jaws were hemisected, and posterior block sections were immersed in 10% buffered formalin fixative solution for ≥48 hours.

#### Immunohistochemistry

Formalin-fixed specimens were decalcified in a 10% EDTA solution for 2 weeks at 4°C. EDTA solution was changed 3 times per week. The maxillae were paraffin-embedded and sagittal sections of 5 µm were obtained, and immunohistochemical staining for rat CD3 was performed. Briefly, the tissue sections were deparaffinized, rehydrated in decreasing gradient of ethanol solutions, submitted to an antigen retrieval step in a pressure chamber (Biocare Medical; Concord, CA) for 15 minutes in citrate buffer (Dako; Glostrup, Denmark) and allowed to cool to room temperature. Monoclonal mouse anti-rat CD3 primary antibodies (cat# 550295 BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ) were incubated on the sections overnight at 4 C in a humidified chamber at 1:100 dilution. Control sections were incubated with pre-immune mouse serum to assess background staining. Detection of the primary antibodies was performed

with biotinylated secondary goat anti-mouse antibodies and an enhanced DAB-based staining system (LSAB-2 staining kit, Dako; Glostrup, Denmark). Sections were counter-stained with Mayer's hematoxyllin for 15 seconds for visualization of the nuclei. Images were captured using a Nikon microscope (Nikon Eclipse 80i) and digital camera (Nikon CCD camera).

#### Cell proliferation and viability

Jurkat cells were obtained from ATCC (American Type Cell Culture, Manassa, VA) and cultured in RPMI medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS). Peripheral human Blood Mononuclear Cells (PBMC) were a kind gift from Dr. Michael Nishimura (Department of Surgery, Medical University of South Carolina, Charleston, SC, USA) and stimulated with anti-CD3 antibody for the expansion of T cells. Cells were plated at  $1 \times 10^6$  cells/ml in 35 mm tissue culture dishes. In the group test FK-506 (Jansen-Cilag, Sao Paulo, Brazil) was added to medium (10  $\mu$ M) 40 minutes prior to IL-2 stimulation (20ng/mL; R&D Systems). The negative control group did not receive any treatment, the control group received only FK-506 (10  $\mu$ M), and the positive control group received only IL-2 (20ng/mL) (R&D Systems). All groups were harvested after 48 hours. Cell proliferation was determined with a flow-cytometry-based assay (Click-iT, Invitrogen Corp.) according to the manufacturer's protocol and

confirmed by direct counting of the viable cells with a hemocytometer on a trypan blue dye exclusion assay.

#### Western Blot analysis

Total protein (cell lysates) was harvested using M-PER (Pierce) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Complete™ - Santa Cruz Biotechnology). A total of 40µg of protein were subjected to 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane (BioRad®) using constant current of 32 mA for 1 hour. After blocking of non-specific binding with 5% non-fat dry milk in TBS-T for 1 hour at room temperature, the membranes were washed 3 times (15 min each) in 0.01% TBS-T and then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies against phosphorylated p65 (cat# sc-7151, Santa Cruz Biotechnology) or phosphorylated p38 (cat# 9211, Cell Signaling Technology). GAPDH expression levels were also detected (cat# sc-25778, Cell Signaling Technology) and used to normalize sample loading. The membranes were washed again in TBS-T and incubated with HRP-conjugated secondary antibody for 60 minutes at room temperature. After repeated washing in TBS-T, detection of the immunocomplexes on the membrane was performed using enhanced chemiluminescence reagents (Super Signal West Pico®, Thermo Scientific) and detected by exposure of radiographic films to the membrane. Digital images of the radiographic films were obtained in a gel

documentation system (ImageQuant, GE Healthcare) and subjected to densitometric analysis using ImageQuant software (GE Healthcare).

#### Data Analysis

All densitometric data are expressed as mean $\pm$ s.e.m. Statistical analysis was performed using Student's t-test (for comparisons between FK506- and vehicle-treated groups). Significance level was set to 95% ( $p < 0.05$ ). Results are representative of at least three independent experiments.

## RESULTS

*FK-506 affects cell proliferation on Jurkat cells and activated T cells from Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC).*

FK-506 decreased proliferation of Jurkat cells. FK-506 completely suppressed cell proliferation as determined by direct counting of viable cells on a hemocytometer (A) and these results were confirmed by the flow cytometry-based assay (B), showing that treatment with FK-506 significantly decreased the proportion of cells in the S phase. The same results were obtained in activated T cells from PBMC in the flow cytometry-based assay (C). To further verify the specificity of the biological effects of FK-506 on the inhibition of calcineurin signaling in T cells, cell proliferation was inhibited even in the presence of exogenous IL-2.

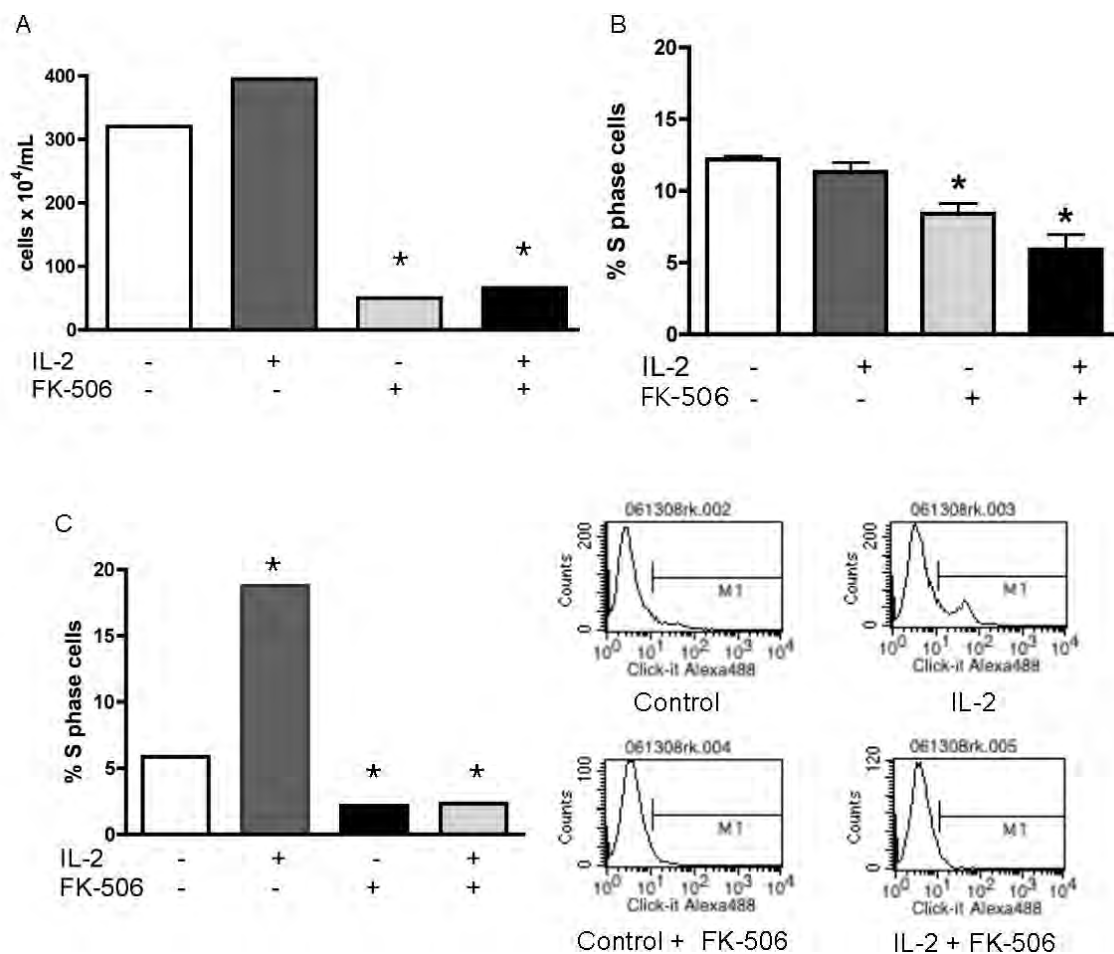


Figure 1 – The same FK-506 presentation used in vivo inhibits proliferation of Jurkat T Cells and PBMC-derived T cells in vitro. Trypan blue dye exclusion (A) and flow cytometry (B) assays demonstrate inhibition of proliferation of Jurkat T cells by FK-506 even in the presence of IL-2 (20ng/mL) stimulation. (C) IL-2 stimulation resulted in a 4-fold increase on the proliferation of PBMC-derived T cells, indicating the biological activity of IL-2, and treatment with FK-506 completely blocked cell proliferation even in the presence of IL-2. This is also shown on the flow cytometry-derived data, where the cells gated on M1 are cells in the S phase of the cell cycle. Results from 3 independent experiments are expressed as mean  $\pm$  SD. \* $p$ <0.05 (one sample t-test).

*FK-506 inhibited LPS-induced activation of p38 MAPK and NF- $\kappa$ B*

FK-506 did not affect the rapid activation of p38 MAPK induced by bacterial LPS in T cells observed 10 minutes after stimulation; however the duration of this activation was significantly shortened. FK-506-treated cells presented significantly ( $p < 0.05$ ) less activation of p38 MAPK 60 minutes after stimulation. There was also a decrease on LPS-induced activation of NF- $\kappa$ B in T cells in the presence of FK-506 treatment, even though this decrease was not statistically significant.

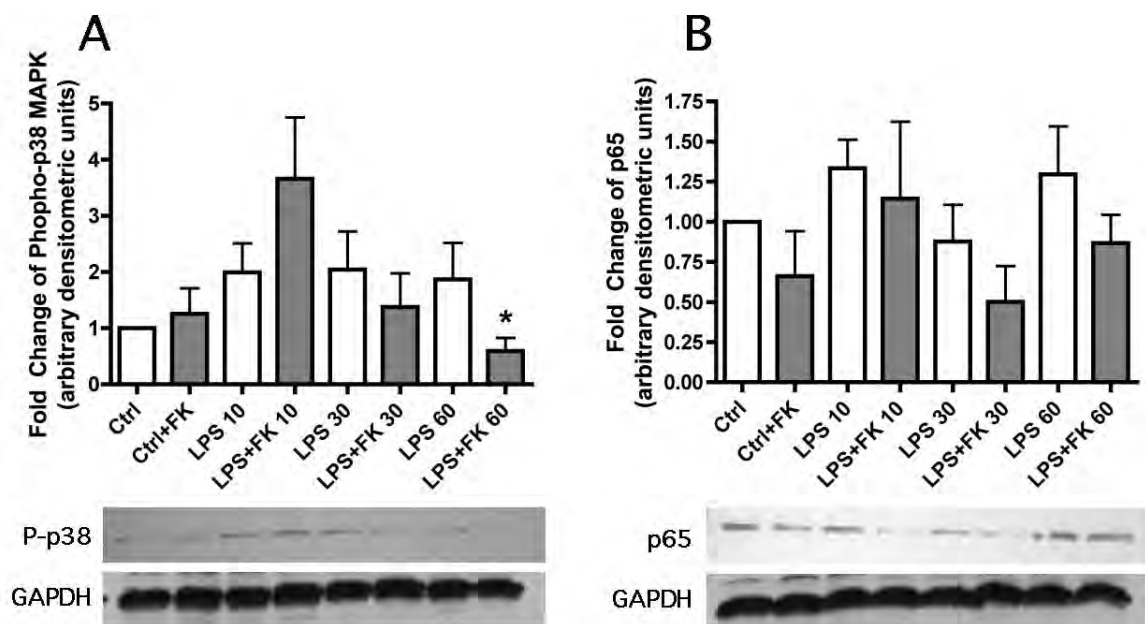


Figure 2 – FK-506 decreased the duration of phospho-p38 MAPK and NF- $\kappa$ B activation induced by bacterial LPS on T cells. Protein samples were harvested 10, 30 and 60 minutes after stimulation with LPS with and without pre-treatment with 10  $\mu$ M of FK-506. (A) Starting at 30 minutes after stimulation, activation of p38 MAPK was suppressed in FK-506-treated cells. (B) After LPS stimulation, FK-506 decreased NF- $\kappa$ B activity on treated cells in all periods. Results from 3 independent experiments are expressed as mean  $\pm$  SD. The images at the bottom are representative of these experiments. \* $p < 0.05$  (one sample  $t$ -test).

*FK-506* decreases the number of CD3-positive cells in experimental periodontal disease

The periodontal tissues of both LPS- and ligature-induced periodontal disease showed intense CD3 staining. This staining indicates the presence of lymphocytes on the inflammation site, where these cells may have an active role on the immune reaction and bone resorption. There is a clear decrease on the intensity of staining in the periodontal tissues of *FK-506*-treated animals in both experimental models. This decrease on the number of lymphocytes may dampen the immune reaction and reduce the severity of bone resorption.

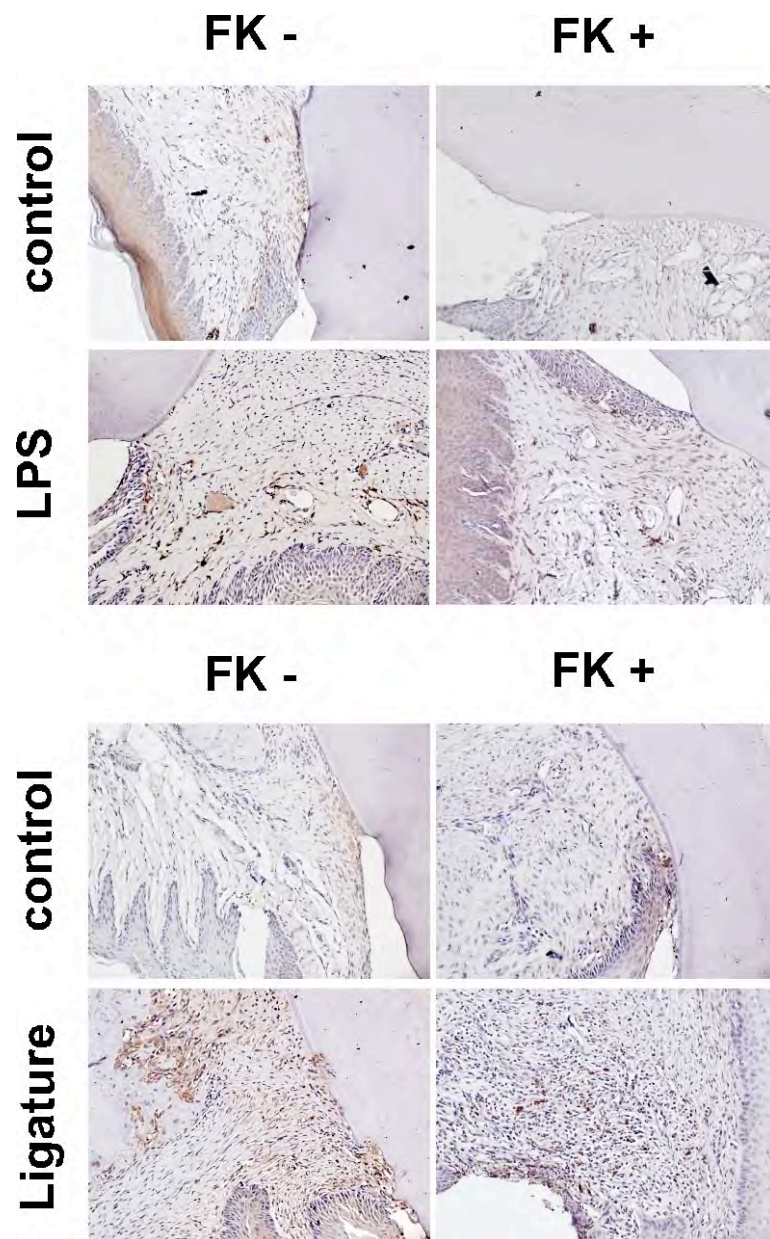


Figure 3 – Immunohistochemical staining of CD3 on the periodontal tissues of animals with LPS- or ligature-induced periodontal disease. Sections from upper (LPS model) or lower first molars (ligature model) show increased positive staining for CD3 in comparison to their respective controls. Interestingly, the presence of lymphocytes, as indicated by CD3 positive staining, was more prominent in the ligature model. FK-506 treatment resulted in a marked decrease of CD3 staining on periodontal disease indicating the decrease on the number of lymphocytes in the diseased areas.

## DISCUSSION

RANKL, as well as M-CSF are cytokines required for osteoclast formation and they are produced primarily by bone marrow stromal cells, osteoblasts, and activated T cells [12-14]. Although RANKL does not induce cell proliferation it promotes the differentiation of osteoclast precursors from an early stage of maturation into fully mature multinucleated osteoclasts. RANKL is also capable of activating mature osteoclasts leading to bone resorption. [8]. Since T cells have been considered as an important source of RANKL on periodontal disease, the reduction of T cell number on the periodontal microenvironment may reduce the amount of RANKL and, therefore, the bone resorptive activity [15-17].

TNF and IL-1 promote RANKL expression by marrow stromal cells and stimulate osteoclast lifespan and activity. These cytokines can activate NF- $\kappa$ B and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways [18, 19]. Activation of p38 MAPK is also relevant for bone homeostasis since it is involved in the regulation of genes such as IL-6, TNF- $\alpha$  and RANKL [19-21] that can contribute toward accelerated bone resorption. Indeed, there has been evidence that inhibition of p38 MAPK in vivo reduces the severity of alveolar bone resorption in experimental periodontal disease model, demonstrating the relevance of this signaling

pathway [22]. NF- $\kappa$ B is also an important signaling pathway due to its involvement in osteoclastogenesis and expression of inflammatory cytokines. Activation of NF- $\kappa$ B leads to cytokine production and/or osteoclast differentiation in precursor cells [23]. Its inhibition reduces the production of pro-inflammatory mediators, such as IL-6 and IL-8 induced by LPS in human gingival fibroblasts [24]. There is also evidence demonstrating that inhibition of NF- $\kappa$ B reduces bone destruction in vivo, in arthritis models [25]. Thus, modulation of NF- $\kappa$ B and p38 signaling pathway could have a therapeutic potential in inflammatory diseases.

Our findings of a decreased number of T cells and inhibition of p38 MAPK and NF- $\kappa$ B in the FK-506-treated animals can represent the mechanism for the decreased severity of the inflammatory infiltrate observed in vivo with FK-506 treatment [9]. This is supported by our in vitro results (figure 1) showing decreased proliferation of FK-506-treated T cells.

RANKL and OPG are considered the main regulatory cytokines in bone resorption, but they can also regulate and affect early differentiation of T and B cells [26, 27]. Activated T cells produce RANKL and directly induce osteoclast differentiation [28]. This decrease on the number of CD3<sup>+</sup> cells in the FK-506-treated animals may, thus, also reduce the potential source of RANKL in the periodontal tissues, which would result in less osteoclasts being activated/recruited.

FK-506 completely blocks IL-1 and LPS- induced RANKL mRNA expression by periodontal fibroblasts (Sartori et al., submitted 2010). Thus, besides suppressing IL-2 signaling and proliferation of T cells, FK-506 can directly modulate RANKL and OPG gene expression, and the regulation of these cytokines in bone marrow stromal cells and in immune cells may also be a part of the mechanism for modulation of bone turnover by FK-506. Even though we cannot rule out a direct effect of FK-506 on RANKL expression by T cells, the reduction on T cell number in the periodontally-disease tissues caused by FK-506 treatment may result in a qualitative/quantitative change on the inflammatory cytokine profile which, in turn, can indirectly modulate RANKL gene expression.

Since T cells are thought to play an important role in periodontal disease [2] and considering the effects of FK-506 on other immune and non-immune cells, it will be interesting to verify the effects of FK-506 on the cytokine profile in T-cell deficient animals. It will also be interesting to assess how FK-506 modulates inflammatory gene expression induced by TLR signaling in T cells.

## CONCLUSION

FK-506 inhibited proliferation of T cells in vitro as well as the activation of p38 MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways induced by LPS. Systemic administration in vivo significantly reduced the presence of lymphocytes on

periodontal tissues in two models of experimentally-induced periodontal disease.

## SUPPORT

This study was supported by FAPESP (The State of Sao Paulo Research Foundation) Grant #05/04428-9, Sao Paulo, Sao Paulo State, and CNPq (National Council for Scientific and Technological Development), Brasilia, DC.

## REFERENCES

1. Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol* 2000 2004; 35:21-41.
2. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol* 2006; 169:987-98.
3. Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot (Tokyo)* 1987; 40:1249-55.
4. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo)* 1987; 40:1256-65.
5. Mitsuyama H, Kambe F, Murakami R, Cao X, Ishiguro N, Seo H. Calcium signaling pathway involving calcineurin regulates interleukin-8 gene expression through activation of NF-kappaB in human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 2004; 19:671-9.
6. Miyata S, Ohkubo Y, Mutoh S. A review of the action of tacrolimus (FK506) on experimental models of rheumatoid arthritis. *Inflamm Res* 2005; 54:1-9.
7. Teng YT, Nguyen H, Gao X, Kong YY, Gorczynski RM, Singh B, et al. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest* 2000; 106:R59-67.

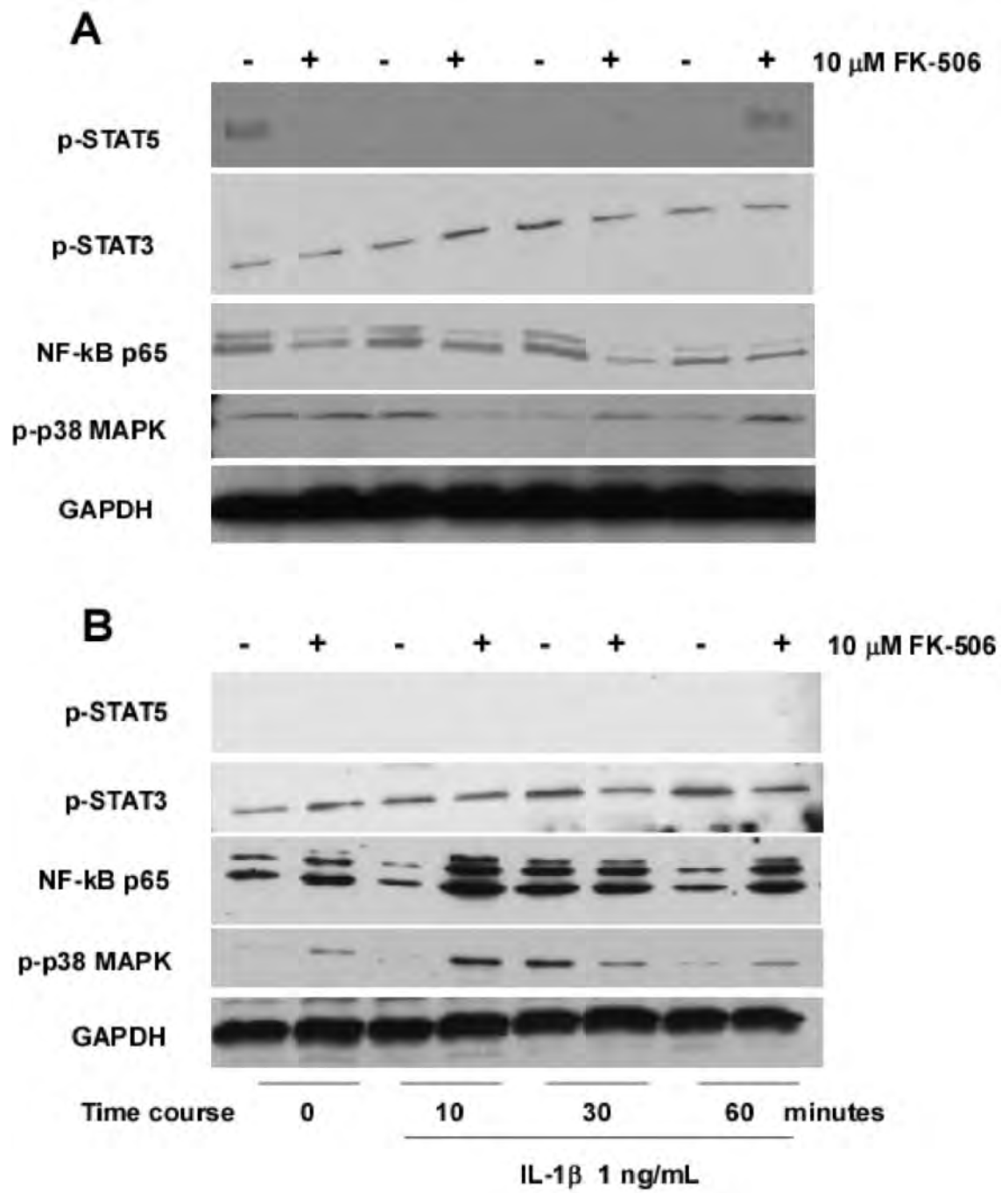
8. Weitzmann MN, Pacifici R. The role of T lymphocytes in bone metabolism. *Immunol Rev* 2005; 208:154-68.
9. Guimaraes MR, Nassar PO, Andia DC, Nassar CA, Spolidorio DM, Rossa C, Jr., et al. Protective effects of Tacrolimus, a calcineurin inhibitor, in experimental periodontitis in rats. *Arch Oral Biol* 2007; 52:882-8.
10. Kirkwood KL, Li F, Rogers JE, Otremba J, Coatney DD, Kreider JM, et al. A p38alpha selective mitogen-activated protein kinase inhibitor prevents periodontal bone loss. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 320:56-63.
11. Garcia de Aquino S, Manzolli Leite FR, Stach-Machado DR, Francisco da Silva JA, Spolidorio LC, Rossa C, Jr. Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. *Life Sci* 2009; 84:745-54.
12. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001; 142:5050-5.
13. Rifas L, Arackal S, Weitzmann MN. Inflammatory T cells rapidly induce differentiation of human bone marrow stromal cells into mature osteoblasts. *J Cell Biochem* 2003; 88:650-9.
14. Weitzmann MN, Cenci S, Rifas L, Haug J, Dipersio J, Pacifici R. T cell activation induces human osteoclast formation via receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-dependent and -independent mechanisms. *J Bone Miner Res* 2001; 16:328-37.
15. Baker PJ, Howe L, Garneau J, Roopenian DC. T cell knockout mice have diminished alveolar bone loss after oral infection with *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 34:45-50.
16. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol* 2005; 76:2033-41.
17. Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC. CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun* 1999; 67:2804-9.
18. Rossa C, Ehmann K, Liu M, Patil C, Kirkwood KL. MKK3/6-p38 MAPK signaling is required for IL-1beta and TNF-alpha-induced RANKL expression in bone marrow stromal cells. *J Interferon Cytokine Res* 2006; 26:719-29.
19. Rossa C, Jr., Liu M, Kirkwood KL. A dominant function of p38 mitogen-activated protein kinase signaling in receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression and osteoclastogenesis induction by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J Periodontal Res* 2008; 43:201-11.
20. Patil C, Rossa C, Jr., Kirkwood KL. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide induces interleukin-6 expression through multiple mitogen-activated protein kinase pathways in periodontal ligament fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21:392-8.
21. Patil C, Zhu X, Rossa C, Jr., Kim YJ, Kirkwood KL. p38 MAPK regulates IL-1beta induced IL-6 expression through mRNA stability in osteoblasts. *Immunol Invest* 2004; 33:213-33.

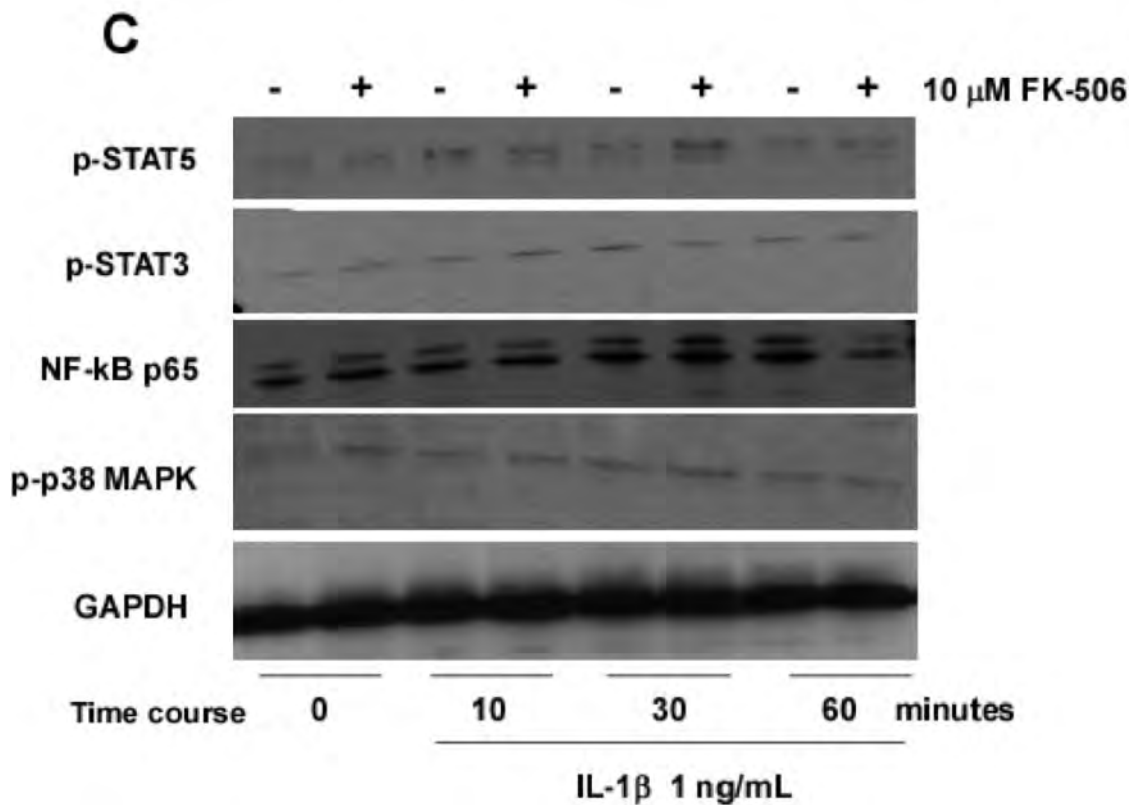
22. Rogers JE, Li F, Coatney DD, Otremba J, Kriegl JM, Protter TA, et al. A p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor arrests active alveolar bone loss in a rat periodontitis model. *J Periodontol* 2007; 78:1992-8.
23. Xu J, Wu HF, Ang ES, Yip K, Woloszyn M, Zheng MH, et al. NF-kappaB modulators in osteolytic bone diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; 20:7-17.
24. Nakajima Y, Furuichi Y, Biswas KK, Hashiguchi T, Kawahara K, Yamaji K, et al. Endocannabinoid, anandamide in gingival tissue regulates the periodontal inflammation through NF-kappaB pathway inhibition. *FEBS Lett* 2006; 580:613-9.
25. Jimi E, Aoki K, Saito H, D'Acquisto F, May MJ, Nakamura I, et al. Selective inhibition of NF-kappa B blocks osteoclastogenesis and prevents inflammatory bone destruction in vivo. *Nat Med* 2004; 10:617-24.
26. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997; 390:175-9.
27. Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM. Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today* 2000; 21:495-502.
28. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999; 397:315-23.

## OUTROS RESULTADOS

### ***Efeito diferencial do tacrolimo na ativação das vias de sinalização intracelular p38 MAPK, NF-kB, STAT3 e STAT5, segundo o tipo celular.***

A ativação de NF-kB induzida por IL-1 $\beta$  foi inibida por tacrolimo em fibroblastos, porém foi aumentada em macrófagos. Da mesma forma, a ativação de p38 MAPK em fibroblastos do ligamento periodontal foi inibida em períodos curtos, porém aumentada tardiamente (30 e 60 minutos), ocorrendo o inverso em macrófagos. Nos osteoblastos, o tratamento com tacrolimo também provocou discreto aumento na ativação de p38 MAPK e NF-kB, exceto na ativação tardia (60 minutos) de NF-kB. STAT3 e STAT5 também não foram afetadas por tacrolimo em fibroblastos ou macrófagos, porém a ativação de STAT5 foi inibida em osteoblastos.

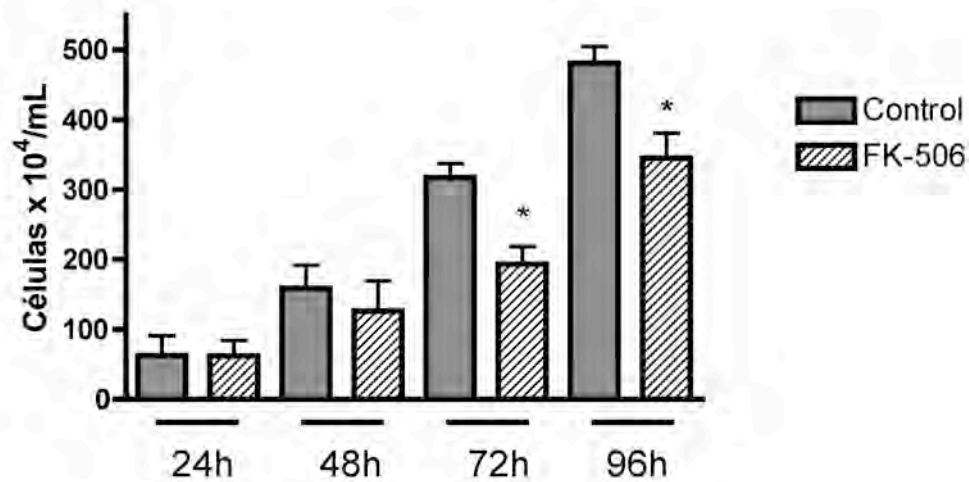




**Figura 5** – Tacrolimo tem efeitos distintos na ativação de vias de sinalização intracelular em diferentes tipos celulares. Foram avaliados três tipos de linhagens celulares: fibroblastos (A), macrófagos (B) e osteoblastos (C). As culturas celulares foram tratadas com 10  $\mu$ M de tacrolimo 30 minutos antes do estímulo com 1ng/mL de IL-1 $\beta$ , as amostras de proteína total coletadas nos períodos indicados e avaliadas para a presença de formas ativas de STAT3, STAT5, p38 MAPK e NF-kB por western blot. Observa-se inibição da ativação de NF-kB em fibroblastos (A), mas não em macrófagos (B) ou osteoblastos (C). A ativação de p38 MAPK foi aumentada em macrófagos e em fibroblastos, sendo que nestes o aumento na ativação foi precedido de marcante inibição no período de 10 minutos após o estímulo. A ativação de STAT5 e STAT3 não foi modulada de forma consistente pelo tacrolimo em nenhum dos tipos celulares. Imagens representativas de três experimentos independentes.

## **Tacrolimo inibe a proliferação de fibroblastos dos tecidos periodontais**

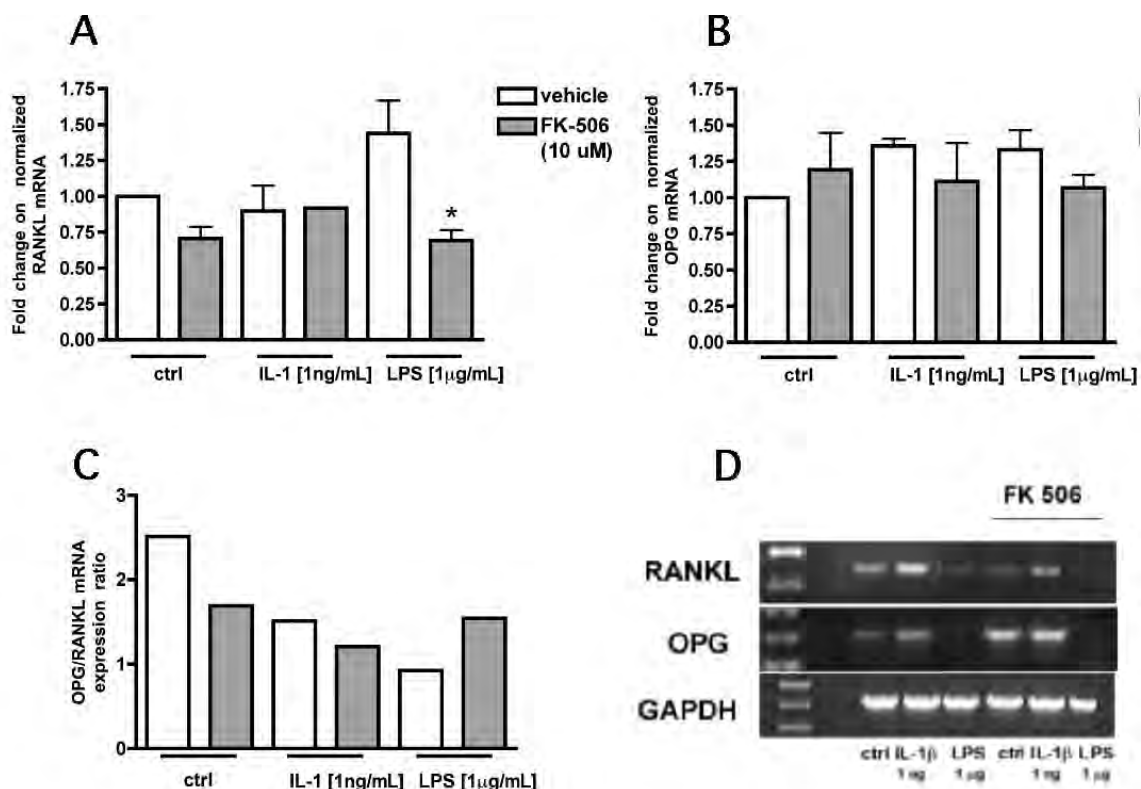
Como o tacrolimo apresenta efeitos anti-proliferativos em células T, efeitos amplamente descritos para esta droga e também verificados por nós em linhagem celular imortalizada (células Jurkat), utilizamos o ensaio de exclusão de azul de Trypan e contagem direta das células em hemocítmetro para verificar os efeitos em células residentes do periodonto. Observamos que o tacrolimo diminuiu a proliferação celular de uma linhagem de fibroblastos do ligamento periodontal de forma significativa a partir do período de 72h, embora o tempo de duplicação desta linhagem celular seja de 48h. Este efeito inibitório sobre a proliferação celular foi mantido até 96 horas. Estes resultados são especialmente interessantes, considerando que esta linhagem de fibroblastos do ligamento periodontal foi imortalizada por alteração do ciclo celular por infecção viral (SV40-large T antigen).



**Figura 6** – Tacrolimo inibe a proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal. O número de células viáveis foi avaliado por contagem direta em hemocitômetro num ensaio de exclusão de azul de trypan nos períodos indicados na presença e ausência de tacrolimo (10  $\mu$ M). Tacrolimo inibiu significativamente a proliferação celular nos períodos de 72 horas ( $p=0.0186$ ) e 96 horas ( $p=0.0344$ ). Resultados a partir de 3 experimentos independentes expressados como  $\text{media} \pm \text{D.P.}$ . \* $p < 0.05$  (teste  $t$  de Student).

### **Tacrolimo modula a expressão de RNAm de RANKL e OPG em osteoblastos**

De forma similar aos resultados que obtivemos em fibroblastos dos tecidos periodontais, verificamos, por meio de RT-PCR, que o tratamento com tacrolimo inibiu a expressão de RNAm de RANKL induzida por IL-1 e LPS em linhagem celular de osteoblastos (células Ros 17/2.8). Esta inibição foi menos marcante após tratamento com IL-1.

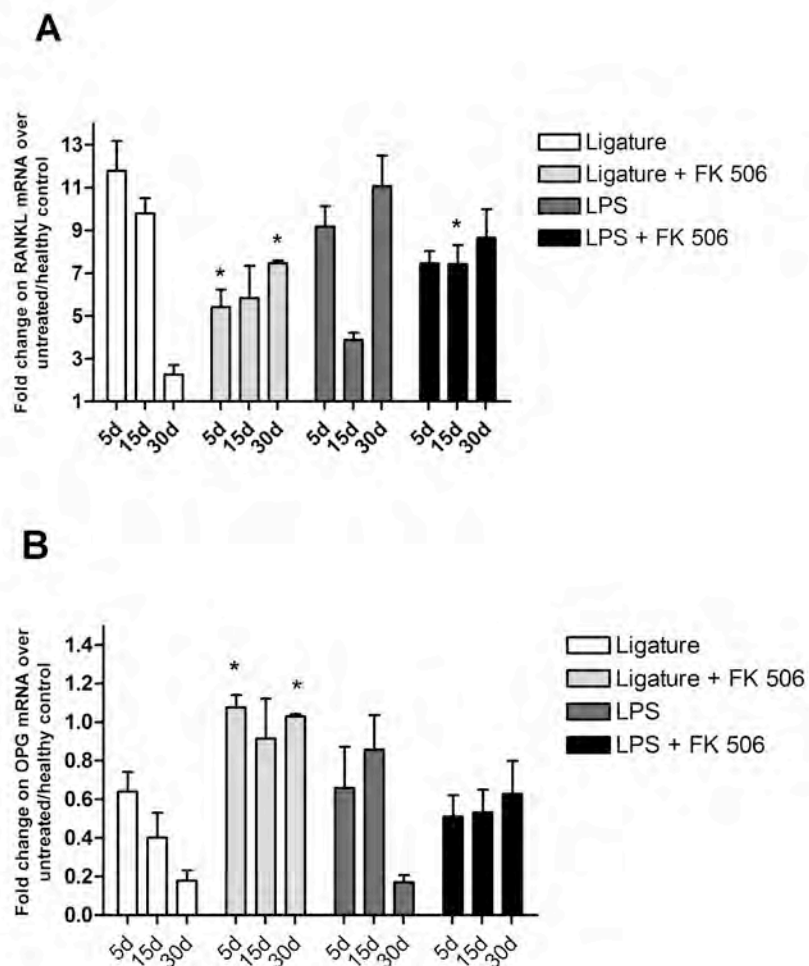


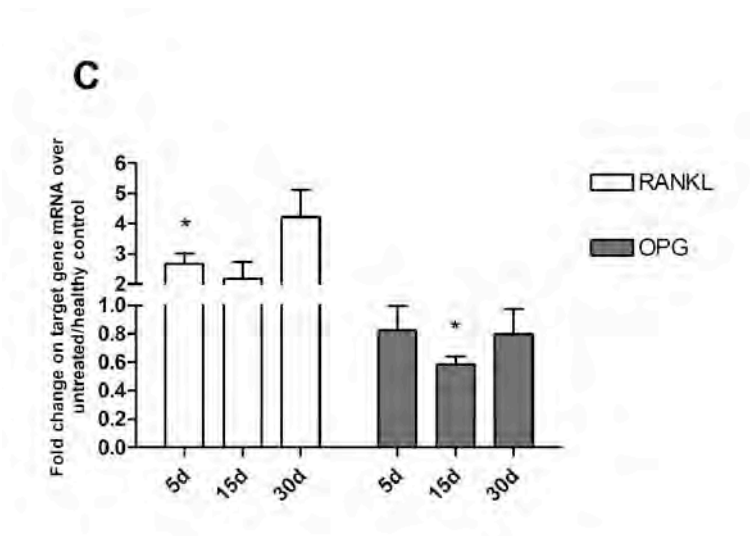
**Figura 7** – Tacrolimo modula a expressão gênica de RANKL e OPG por osteoblastos após tratamento com IL-1 e LPS bacteriano. Imagem representativa dos resultados dos experimentos de RT-PCR demonstrando a regulação da expressão de RNAm para RANKL e OPG após estímulo com diferentes agonistas na presença e ausência de tacrolimo (10 $\mu$ M). Osteoblastos (células Ros 17/2.8) foram estimulados com IL-1 ou LPS bacteriano nas concentrações indicadas, por 24 horas, o RNA total foi isolado, convertido em cDNA e a expressão de RNAm de RANKL e OPG avaliada por PCR. Observa-se inibição da expressão de RANKL e aumento da expressão de OPG nas células tratadas com tacrolimo após estímulo com os mesmos agonistas. Imagem representativa de três experimentos independentes.

### **Tacrolimo modula a expressão de RANKL e OPG in vivo**

Utilizamos dois modelos experimentais de indução de doença periodontal, no entanto a administração sistêmica de tacrolimo resultou em inibição de RNAm de RANKL e aumento da expressão de RNAm de OPG, apenas no modelo de doença periodontal induzida por ligadura. A inibição da expressão de RNAm para RANKL nos animais tratados com tacrolimo foi significativa nos períodos de 5 e 15 dias, enquanto no período de 30 dias esta tendência se reverteu e o tratamento com tacrolimo resultou em níveis significativamente maiores de RNAm para RANKL. No modelo de injeção de LPS, o tratamento dos animais com tacrolimo não resultou em efeitos significativos sobre a expressão de RNAm para RANKL; apenas no período de 15 dias observamos maiores níveis de RANKL em comparação aos animais do grupo controle. A regulação da expressão de RNAm para OPG também apresentou resultados distintos nos dois modelos experimentais: observamos significativo aumento na expressão de OPG nos animais tratados com tacrolimo no modelo de ligadura, enquanto no modelo de injeção de LPS não houve efeito significativo do tacrolimo sobre os níveis de RNAm para OPG. Na ausência de inflamação induzida experimentalmente, observamos que a administração de tacrolimo não afetou a expressão de RANKL e OPG, exceto por um aumento discreto mas significativo nos níveis de RNAm para RANKL no período de 5 dias. A avaliação por imunohistoquímica demonstrou que o tratamento com tacrolimo inibiu a

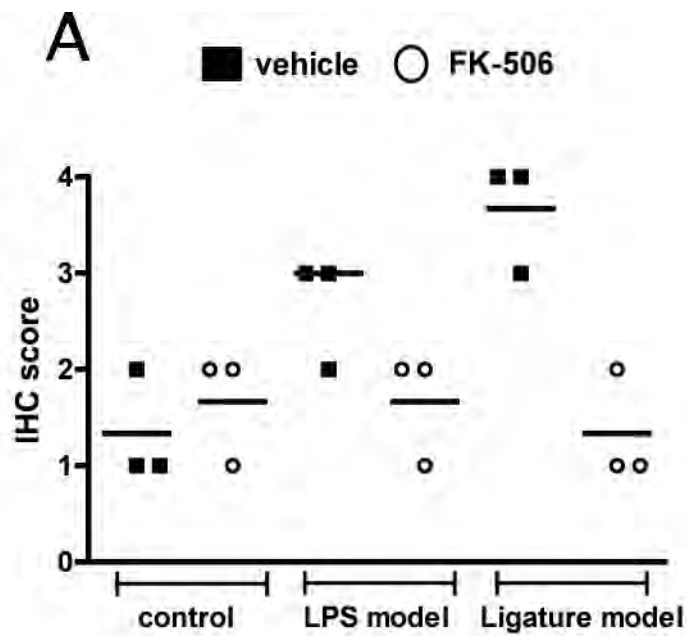
expressão de RANKL nos tecidos periodontais em ambos os modelos experimentais de doença periodontal. Estes resultados estão de acordo com a regulação em nível de RNAm no modelo de ligadura, no entanto há incoerência dos achados da imunohistoquímica com os resultados da expressão de RNAm de RANKL no modelo de LPS.





**Figura 8** – Modulação da expressão gênica de RANKL e OPG nos tecidos periodontais in vivo. Foram utilizados dois modelos experimentais para indução da doença periodontal: colocação de ligaduras e injeção de LPS bacteriano. Os animais receberam injeções intraperitoneais de tacrolimo ou do veículo diariamente e amostras de tecido gengival foram obtidas nos períodos indicados (5, 15 e 30 dias). O RNA total foi extraído das amostras destes tecidos, convertido em cDNA e a expressão de RNAm para RANKL e OPG avaliada por PCR. As barras indicam a média e as linhas verticais o desvio-padrão da análise densitométrica realizada em imagens digitalizadas dos géis de agarose utilizados para separação eletroforética dos produtos da reação de PCR. Os resultados são expressos em *fold change* em relação ao dia 0 (dia do início dos modelos experimentais) e representam três animais por período e grupo experimental. Os resultados para expressão de RANKL são apresentados em (A), para OPG em (B) segundo o modelo experimental utilizado (ligadura ou LPS). Observa-se que o tacrolimo resultou em inibição de RANKL e aumento de OPG apenas no modelo de ligadura. Em (C) são apresentados os resultados obtidos para os tecidos periodontais normais, sem indução de doença periodontal e verifica-se que o tratamento com tacrolimo não resultou em um padrão de regulação da expressão gênica consistente tanto para RANKL como para OPG. Em (C) o asterisco (\*)

indica diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao valor '1' atribuído ao controle saudável não tratado com tacrolimo pelo teste t de uma amostra (one-sample t test), enquanto em (A) e (B) o (\*) indica diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao mesmo período nos animais não tratados com tacrolimo (teste t não pareado).



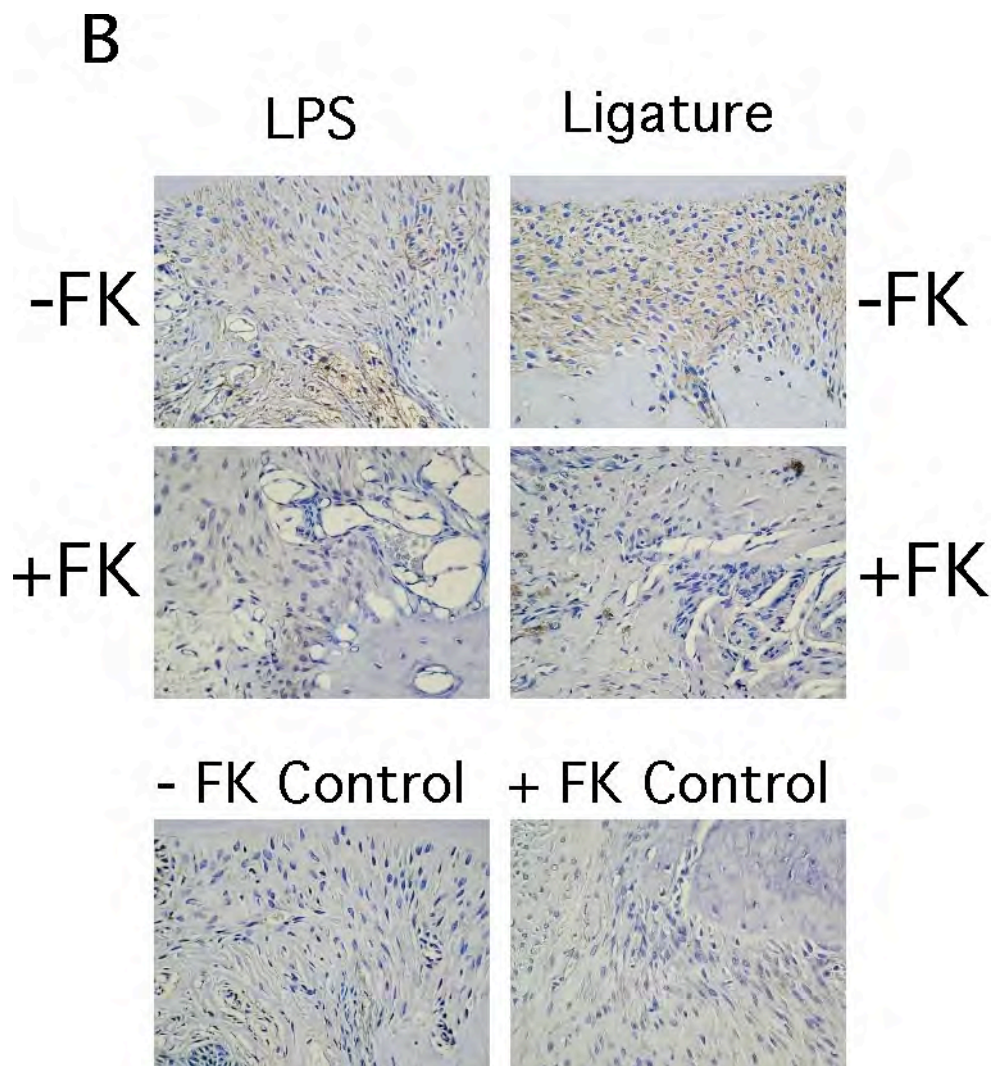


Figura 9 – (A) Gráfico descritivo da avaliação da imunohistoquímica para expressão protéica de RANKL nos tecidos periodontais dos animais. Os scores representam a intensidade de marcação nos tecidos avaliados. 1 (0%). 2 (1%-30%). 3 (31%-60%). 4 (61%-100%). Tacrolimo diminuiu a expressão de RANKL nos modelos de LPS e ligadura para indução experimental da doença periodontal em ratos. Animais que não receberam a droga e tiveram indução de doença periodontal, exibiram intensidade maior de marcação de RANKL nos tecidos. (B) Imagens representativas dos cortes de imunohistoquímica para RANKL. Nota-se que os cortes histológicos dos animais submetidos a doença periodontal experimental e não tratados com apresentaram marcação para RANKL mais intensa do que os animais controle e também do que os animais com doença periodontal e tratados com tacrolimo.

DISCUSSÃO

## **5. DISCUSSÃO**

Nossos resultados demonstram que a administração de tacrolimo pode modular o turnover do tecido ósseo nas doenças periodontais e que esta modulação pode ocorrer por, pelo menos, três mecanismos que podem atuar de forma independente e/ou sinérgica: 1) regulação direta da expressão de RANKL e OPG; 2) alteração da resposta imune nos tecidos periodontais por redução do número de células T e 3) modulação da ativação de vias de sinalização importantes para a expressão de genes direta ou indiretamente relacionados à osteoclastogênese (por exemplo, c-Fos, interferon-gama, TNF- $\alpha$ ). Estes resultados suportam achados prévios de nosso grupo de pesquisa (Guimaraes et al.<sup>19</sup>, 2007) que demonstraram que a administração do tacrolimo in vivo inibiu a reabsorção óssea em modelo experimental de doença periodontal.

No entanto, na ausência de inflamação a administração de tacrolimo por 28 dias em ratos teve efeitos opostos ao induzir uma condição semelhante à osteoporose. Esta condição é caracterizada por redução da densidade e trabeculado de ossos longos, aumento do número de osteoclastos e aumento da expressão de RNAm do fator de diferenciação de osteoclastos (*osteoclast differentiation factor*, ODF ou RANKL), enquanto a expressão do fator inibidor de osteoclastogênese (*osteoclastogenesis inhibitory factor*, OCIF ou OPG) não foi afetada de

modo significativo (Fukunaga et al.<sup>13</sup>, 2004). Contudo, a administração prolongada (30 dias) de tacrolimo in vivo na ausência de inflamação do periodonto não levou (Guimaraes et al.<sup>19</sup>, 2007) à alterações no osso alveolar, seja em relação à osteoclastogênese, seja em relação ao volume de tecido ósseo (Nassar et al.<sup>41</sup>, 2009). Por outro lado, a administração de ciclosporina levou ao aumento da atividade de reabsorção e perda de densidade do osso alveolar em ratos de forma similar ao relatado para a administração de tacrolimo em ossos longos, enquanto na presença de inflamação associada à doença periodontal induzida foi verificado efeito protetor da ciclosporina sobre o tecido ósseo, similar ao observado com a administração de tacrolimo (Nassar et al.<sup>40</sup>, 2004). Os efeitos deletérios da ciclosporina sobre o turnover ósseo na ausência de inflamação parecem ser temporários, uma vez que houve uma redução progressiva destes efeitos com a administração prolongada (8 meses) da droga (Spolidorio et al.<sup>53</sup>, 2004). Assim, é possível que os efeitos deletérios do tacrolimo sobre o tecido ósseo também sejam atenuados com o tempo, ou que as diferenças observadas em ossos longos e no osso alveolar sejam devidas às características anátomo-histológicas das diferentes áreas.

É interessante notar que a substituição da ciclosporina por tacrolimo levou à reversão dos efeitos deletérios sobre o turnover ósseo na ausência da inflamação (Spolidorio et al.<sup>52</sup>, 2007), demonstrando que embora ambas as drogas sejam imunossupressores que agem primariamente por inibição da via da calcineurina/NFAT, elas apresentam

efeitos distintos sobre o tecido ósseo. Esta inibição da atividade de reabsorção óssea do tacrolimo parece estar relacionada à modulação da osteoclastogênese, reduzindo o número e atividade dos osteoclastos (Andia et al.<sup>2</sup>, 2008); porém estes resultados podem ser dependentes da região ou do tipo de osso, uma vez que em ossos longos a administração de tacrolimo resultou em estímulo à osteoclastogênese (Fukunaga et al.<sup>13</sup>, 2004). In vitro, foi demonstrado que a inibição da via da calcineurina reduz de forma significativa a osteoclastogênese induzida por RANKL (Hirotsu et al.<sup>21</sup>, 2004; Miyazaki et al.<sup>38</sup>, 2007). A confirmação da relevância da via da calcineurina/NFAT para a osteoclastogênese foi feita com a utilização de peptídeo sintético para a inibição da calcineurina que também se mostrou eficiente na inibição da osteoclastogênese e verificada pela expressão de forma mutante constitutivamente ativa de NFAT (o oposto da inibição da calcineurina), que se mostrou suficiente para induzir a osteoclastogênese independentemente da adição de RANKL exógeno (Hirotsu et al.<sup>21</sup>, 2004). Além de afetar a sinalização e/ou os efeitos de RANKL em células precursoras de osteoclastos, os dados deste trabalho demonstram que tacrolimo pode afetar a osteoclastogênese pela inibição da expressão gênica de RANKL.

Existem evidências sugerindo que as ações do tacrolimo podem modular o turnover do tecido ósseo também por estímulo à osteogênese, por exemplo, favorecendo a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, por meio do aumento da proliferação, da

atividade de fosfatase alcalina, da expressão de RNAm de osteocalcina e da formação de nódulos mineralizados in vitro e in vivo (Dai et al.<sup>9</sup>, 2008). Por outro lado, em osteoblastos ‘maduros’ o tratamento com tacrolimo inibiu a proliferação celular e também a expressão de genes (Cbfa1 e osterix ou Runx2) relacionados à diferenciação osteoblástica e produção de matriz osteóide (Varanasi, Datta<sup>63</sup>, 2005). Assim, tacrolimo exerce efeitos distintos em diferentes tipos celulares, além do alvo-celular ‘típico’ (linfócitos T), bem como em diferentes estágios de diferenciação celular, demonstrando a relevância do estudo de seus efeitos em diferentes tipos celulares.

O efeito protetor dos imunossupressores no tecido ósseo pode ser devido à modulação da expressão de citocinas inflamatórias, o qual pode estar associado aos efeitos desta droga sobre vias de sinalização importantes para a expressão de genes inflamatórios: p38 MAPK e, especialmente, a via do NF- $\kappa$ B. A inibição de NF- $\kappa$ B mediada por tacrolimo que observamos em linfócitos T, fibroblastos e osteoblastos foi também observada em outros tipos celulares ‘não-imunes’ e parece estar relacionada às modificações pós-traducionais por meio da indução de resposta à proteína desnaturada (*‘unfolded protein response’*, UPR) via aumento da expressão do fator de transcrição C/EBP $\beta$ . Estes eventos estão diretamente relacionados à dessensibilização de células epiteliais do túbulo renal de ratos à ativação de NF- $\kappa$ B após estímulo com TNF- $\alpha$ . A inibição da expressão da citocina proteína quimioatraente para

monócitos-1 (monocyte-chemoattractant protein-1, MCP-1) induzida por IL-1 $\beta$  neste mesmo tipo celular ocorreu sem modulação da ativação de NF-kB, demonstrando que tacrolimo pode modular múltiplas vias de sinalização intracelular (Du et al.<sup>11</sup>, 2009). Por outro lado, tanto ciclosporina quanto tacrolimo inibiram a ativação de NF-kB induzida por *phorbol-myristate acetate* (PMA) mas não por TNF- $\alpha$  em osteoblastos (Mitsuyama et al.<sup>37</sup>, 2004). A ativação de NF-kB por PMA tem cinética mais lenta (30 min) enquanto o tratamento com TNF- $\alpha$  resulta em ativação mais rápida (15 min), num resultado semelhante ao que observamos em células osteoblásticas (inibição da ativação tardia de NF-kB por tacrolimo). Esta ação diferencial de ciclosporina e tacrolimo na ativação de NF-kB por diferentes estímulos sugere a existência de um mecanismo ligando a inibição da sinalização pela via da calcineurina/NFAT e subsequente ativação de NF-kB.

Tacrolimo, mas não a ciclosporina, foi capaz de inibir, de forma dose-dependente, a ativação de p38 MAPK por estímulos osmóticos (Sanchez-Perez et al.<sup>48</sup>, 2004). Por outro lado, os resultados deste mesmo estudo demonstram que, na ausência de estímulos osmóticos, doses menores (1 e 10 ng/mL) de tacrolimo resultaram em distinto aumento da ativação de p38 MAPK, num resultado semelhante ao obtido neste trabalho. Mais recentemente foi verificado o efeito inibidor do tacrolimo na ativação de ERK, p38 e JNK MAPKinases induzida por estresse de hipotermia em células endoteliais (Diestel et al.<sup>10</sup>, 2009).

Apesar do tratamento de células precursoras de osteoclastos com RANKL levar à ativação de ERK, JNK e p38 e da capacidade de tacrolimo inibir a ativação destas três MAPKinases, decidimos avaliar o efeito de tacrolimo na ativação de p38 devido às evidências, *in vitro* (Huang et al.<sup>24</sup>, 2006; Matsumoto et al.<sup>35</sup>, 2000) e *in vivo* (Kirkwood et al.<sup>33</sup>, 2007) do papel fundamental desta via de sinalização na osteoclastogênese. Nossos resultados demonstram que o tacrolimo teve efeitos distintos na ativação de p38 após estímulo com IL-1 $\beta$  segundo o tipo celular considerado. Estes resultados são de difícil interpretação, mas podemos especular que a ativação de p38 MAPK em diferentes tipos celulares pode seguir distintas vias subsequentemente à ativação inicial do receptor de membrana e também que os mecanismos moleculares de ação do tacrolimo podem variar segundo as proteínas-kinase ativadas na via de sinalização '*upstream*' que resultará na ativação da p38.

É interessante ressaltar que os efeitos do tacrolimo foram verificados não apenas em linfócitos T, as 'células-alvo' deste composto, mas também em outros tipos celulares envolvidos na resposta imune inata, como fibroblastos e osteoblastos. Nestes tipos celulares, inibidores da calcineurina, como o tacrolimo, podem exercer efeitos opostos aos verificados em células da resposta imune adaptativa, isto é, efeitos pró-inflamatórios com aumento da expressão de genes inflamatórios como IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$  e iNOS (Conboy et al.<sup>7</sup>, 1999); e pode inclusive atuar de forma sinérgica na expressão de mediadores inflamatórios após a

ativação de TLRs (Kang et al.<sup>27</sup>, 2007). Recentemente, foi demonstrado que os efeitos do tacrolimo em células da resposta imune inata são radicalmente distintos de seus efeitos sobre linfócitos, com aumento, de forma sinérgica com a ativação de TLR, a ativação de NF-κB e a expressão de genes inflamatórios dependentes da ativação de NF-κB em células dendríticas e macrófagos. Além desta atividade sinérgica na ativação inicial por TLRs, o tacrolimo parece estar relacionado à indução de tolerância ao LPS em macrófagos, possivelmente por meio da ativação de um mecanismo de feedback negativo que dessensibiliza estas células ao LPS (Jennings et al.<sup>25</sup>, 2009).

Nos experimentos deste trabalho utilizamos tanto um modelo de injeção de LPS quanto a colocação de ligadura para indução de inflamação e reabsorção do osso alveolar. O modelo de injeção de LPS óssea periodontal é amplamente utilizado (Ambili et al.<sup>1</sup>, 2005; Rogers et al.<sup>45</sup>, 2007; Sartori et al.<sup>49</sup>, 2009), mas apresenta diferenças importantes com o modelo de colocação de ligaduras em relação às características da inflamação e das vias de sinalização intracelular ativadas (Garcia de Aquino et al.<sup>16</sup>, 2009). No modelo de injeção de LPS, o estímulo inicial é limitado à ativação de TLR4; enquanto no modelo de colocação de ligadura, além da possibilidade de participação de um estímulo mecânico com a indução da resposta inflamatória aguda mais intensa inicialmente, o acúmulo de microrganismos viáveis implica na participação de diferentes antígenos ou padrões moleculares associados

à patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*), como toxinas e produtos do metabolismo microbiano, CpG DNA, flagelos e peptideoglicanos. Cada modelo tem suas vantagens e desvantagens; porém apesar de não termos concluído as análises descritivas e estereométricas, não podemos excluir a possibilidade de que a redução da severidade da resposta inflamatória observada em ambos os modelos experimentais nos animais tratados com tacrolimo seja, ao menos em parte, devida à 'dessensitização' ao LPS por um mecanismo de tolerância. tacrolimo também pode afetar o influxo de células da resposta imune inata, notadamente neutrófilos, por meio da modulação da expressão de quimiocinas (como CXCL1, CXCL2 e CXCL8) pelas células T, como demonstrado em modelo animal de colite (van Lierop et al.<sup>62</sup>, 2010). Este pode ser um dos mecanismos de diminuição da severidade da inflamação em ambos os modelos de indução de doença periodontal utilizados neste trabalho.

Apesar das diferenças entre os dois modelos experimentais de indução da doença periodontal utilizados neste trabalho, observamos uma redução na quantidade de linfócitos T e na expressão de RANKL (ambos dados *in vivo*) em ambos os modelos. Estes dados são contrários a outros relatos demonstrando aumento da expressão de RANKL em animais tratados com tacrolimo, no entanto este contraste pode ser explicado pela presença (nos modelos experimentais utilizados neste trabalho) ou ausência de inflamação induzida no modelo de osteoporose

(Fukunaga et al.<sup>13</sup>, 2004). Além disso, no modelo de LPS observamos diferenças na expressão de RANKL em nível de RNAm por RT-PCR e em nível protéico por imunohistoquímica. Esta falta de correspondência entre transcrição e tradução de RANKL no modelo de LPS pode ser devida ao envolvimento de mecanismos de regulação pós-transcricional (maior estabilização do RNAm de RANKL e menor eficiência na tradução ou no processamento pós-traducional da proteína), à regulação diferencial da rede de citocinas associada ao modelo de LPS pelo tacrolimo, os quais podem afetar indiretamente a transcrição de RANKL; ou ainda às próprias diferenças na população de células presentes nos tecidos periodontais em cada modelo que seriam afetadas de forma distinta pelo tacrolimo. A avaliação estereométrica com contagem de osteoclastos e avaliação da atividade de reabsorção óssea irá fornecer maiores informações sobre estes efeitos diferenciais do tacrolimo sobre a modulação do turnover ósseo em cada modelo experimental.

O alvo principal do tacrolimo é a via da calcineurina em linfócitos T, formando um complexo intracelular com a proteína FKBP12 (Mitsuyama et al.<sup>37</sup>, 2004; Hendrickson et al.<sup>20</sup>, 1993). Sua ação ocorre pela inibição da atividade da fosfatase de serina/treonina denominada calcineurina, afetando a atividade do fator de ativação nuclear de células T (NFAT) e, conseqüentemente, a expressão de um grande número de citocinas e outros genes envolvidos na iniciação e modulação da resposta imune (Crabtree, Olson<sup>8</sup>, 2002; Rao et al.<sup>44</sup>, 1997). Por exemplo,

especificamente em células T, tacrolimo inibe a expressão de IL-2 e, conseqüentemente, sua proliferação (Ho et al.<sup>22</sup>, 1996). A diminuição do infiltrado inflamatório e de reabsorção óssea observado em nossos resultados prévios (Guimaraes et al.<sup>19</sup>, 2007) podem ser explicados por esse efeito específico do tacrolimo em células T. A diminuição do número de linfócitos T nos tecidos afetados pela doença periodontal reduziria a disponibilidade no local de RANKL produzido pelas próprias células T e células residentes, como demonstrado em nossos resultados de imunohistoquímica para linfócitos T e para RANKL in vivo, e pela diminuição da produção de RANKL por fibroblastos in vitro. Estes resultados in vitro obtidos em fibroblastos e em osteoblastos contradizem o relato de estímulo à expressão de RANKL e inibição da expressão de OPG em osteoblastos tratados com tacrolimo (Hofbauer et al.<sup>23</sup>, 2001). No entanto, estes resultados foram obtidos na ausência de co-estimulação com citocinas ou LPS e utilizando doses muito mais elevadas de tacrolimo (1 µg/mL). Além disso, a expressão de RANKL foi avaliada apenas em nível de RNAm.

A utilização de droga imunossupressora potente como o tacrolimo no tratamento das doenças periodontais não é viável em termos do risco/benefício ao paciente devido à neurotoxicidade, nefrotoxicidade e alterações do metabolismo lipídico associados ao uso da droga. Terapias visando a modulação da resposta imune têm sido, entretanto, intensamente estudadas recentemente em diversas condições

inflamatórias. Drogas antiinflamatórias não esteroidais tem sido usadas na tentativa de se controlar e inibir a resposta inflamatória (Serhan et al.<sup>50</sup>, 2007).

O entendimento dos mecanismos de ação do tacrolimo na modulação das respostas do hospedeiro na doença periodontal pode proporcionar informações úteis ao desenvolvimento de terapias baseadas na imunomodulação por exemplo, com a identificação de vias de sinalização importantes para a expressão de mediadores inflamatórios críticos para os processos de destruição tecidual que se deseja inibir, o que pode ser efetuado por outros compostos com menor toxicidade ou sem efeitos indesejáveis. Alternativamente, a identificação da porção ativa da molécula responsável pelo efeito desejado (por ex., inibição de NF- $\kappa$ B) pode ser utilizada na busca por um composto alternativo que tenha efeito similar ou no desenvolvimento de composto sintético que não apresentem os efeitos indesejáveis do tacrolimo. No caso do tacrolimo, um peptídeo de 16 resíduos de aminoácidos com alta afinidade pela calcineurina e capaz de inibir sua atividade (VIVIT) foi identificado (Aramburu et al.<sup>3</sup>, 1999). A expressão deste peptídeo em células precursoras de osteoclastos inibiu eficientemente a osteoclastogênese induzida pelo tratamento com RANKL (Hirotsu et al.<sup>21</sup>, 2004), porém não encontramos relatos sobre o uso desta estratégia in vivo. Como a inibição da calcineurina afeta a fosforilação/desfosforilação de diversas proteínas além de NFAT, o uso do peptídeo VIVIT que também inibe a calcineurina

pode resultar em efeitos colaterais indesejáveis, sugerindo que a inibição seletiva e transitória/reversível de NFAT (por exemplo) pode minimizar estes efeitos indesejáveis e ao mesmo tempo possibilitar a modulação da osteoclastogênese (Kaminuma<sup>26</sup>, 2008).

Além disso, é preciso destacar que no experimento in vivo utilizamos apenas a administração sistêmica da droga. Uma possibilidade seria a de utilizar administração local da droga, a qual inclusive foi a primeira apresentação desta droga, incluída em pomadas para uso tópico no tratamento de dermatite atópica (Kaminuma<sup>26</sup>, 2008). Outra possibilidade seria a utilização de doses reduzidas em comparação às utilizadas para obtenção de imunossupressão sistêmica, de forma similar ao realizado com a doxiciclina, em que doses reduzidas proporcionam uma atividade inibidora de metaloproteases sem função antimicrobiana (Emingil et al.<sup>12</sup>, 2004; Gapski et al.<sup>15</sup>, 2004; Golub et al.<sup>17</sup>, 1995). É interessante notar que existem evidências de que tacrolimo modula a expressão de metaloproteases induzida por IL-1 $\beta$  em sinoviócitos de pacientes com artrite reumatóide, notadamente de MMP-13 que tem sua expressão mais restrita à situações patológicas, e não de MMP-2, mais associada à remodelação e homeostase do tecido conjuntivo (Migita et al.<sup>36</sup>, 2005). Estes dados ilustram os múltiplos mecanismos pelos quais o tacrolimo pode afetar a modulação da destruição tecidual mediada pela resposta imune-inflamatória.

Com base nas evidências discutidas e nos resultados obtidos neste trabalho, especulamos que o efeito do tacrolimo no turnover do tecido ósseo, seja o estímulo ou a inibição da reabsorção óssea, depende da natureza e característica dos tecidos adjacentes ao tecido ósseo, isto é, da presença ou não de uma reação imune-inflamatória e também da natureza/características (tipos celulares predominantes) desta reação. Por exemplo, na presença de inflamação associada aos modelos de doença periodontal experimental o tacrolimo tem efeito protetor no tecido ósseo, o qual pode ser devido à modulação da expressão de citocinas inflamatórias, tanto diretamente pela modulação de vias de sinalização (notadamente, p38 MAPK e NF- $\kappa$ B) relevantes para a expressão de mediadores inflamatórios e também de RANKL e OPG, como indiretamente, por meio da redução do número de linfócitos T presentes na área.

Algumas avaliações poderiam ter sido feitas para caracterizar os efeitos da administração de tacrolimo sobre a resposta imune associada às doenças periodontais in vivo: determinação do perfil de citocinas presentes (Th1, Th2 ou Th17); quantificação da perda óssea ocasionada pela doença periodontal por medição da área da raiz exposta macroscopicamente ou por micro-tomografias. Estas avaliações poderão ser feitas em estudos futuros; entretanto outras análises ainda serão realizadas como seqüência dos experimentos deste trabalho, a saber:

- contagem de osteoclastos nos tecidos periodontais afetados pela doença periodontal em animais tratados ou não com o imunossupressor;
- estereometria dos cortes histológicos para avaliação da intensidade da inflamação

Considerando os efeitos do tacrolimo em células imunes e não-imunes, será interessante investigar os efeitos do imunossupressor em animais que não apresentam células T (camundongos *nude*, por exemplo), avaliando o perfil das citocinas produzidas. A administração de ciclosporina em camundongos *nude* não levou à aumento da atividade de reabsorção óssea com alterações típicas de osteoporose observadas em animais controle que apresentam número normal de células T, demonstrando não apenas a relevância deste tipo celular para a homeostase do tecido ósseo, mas também que a diminuição do número de linfócitos T é um mecanismo importante na modulação do tecido ósseo por inibidores de calcineurina (Buchinsky et al.<sup>5</sup>, 1996). Outro ponto de interesse seria avaliar como tacrolimo modularia a expressão gênica induzida pela ativação de TLRs em células T. A elucidação dos efeitos específicos do tacrolimo na expressão de RANKL por células residentes do periodonto, como fibroblastos e células imunes, e também por linfócitos T, pode prover informações importantes para o desenvolvimento de drogas ou estratégias terapêuticas para a modulação do *turnover* ósseo nas doenças imune-inflamatórias.

CONCLUSÃO

## **6. CONCLUSÃO**

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que:

- 1- tacrolimo inibe de forma marcante a expressão de RANKL e com menor magnitude também a expressão de OPG induzida por IL-1 e LPS bacteriano em fibroblastos do tecido periodontal in vitro. Esta inibição ocorreu tanto em nível de RNAm quanto protéico;
- 2- o tratamento com tacrolimo in vivo resultou na redução do número de linfócitos presentes nos tecidos periodontais nos dois modelos experimentais de doença periodontal em ratos;
- 3- tacrolimo inibiu a ativação das vias de sinalização intracelular p38 MAPK e NF- $\kappa$ B, induzida por ativação de TLR-4 em fibroblastos e em 2 linhagens de células T; e inibiu a proliferação in vitro de células T.

De um modo geral, é possível concluir que o tacrolimo afetou a expressão de RANKL e de OPG em células residentes dos tecidos periodontais in vitro, alterando a proporção relativa da expressão destes genes de forma a reduzir a atividade de reabsorção óssea. In vivo, verificamos que os mecanismos pelos quais o tacrolimo pode inibir a

reabsorção óssea induzida por estímulos inflamatórios e microbianos in vivo incluem a redução da expressão de RANKL, a diminuição do número de linfócitos nos tecidos periodontais e a modulação da atividade de vias de sinalização relevantes para a expressão de genes inflamatórios.

## REFERÊNCIAS

## **7. REFERÊNCIAS**

1. Ambili R, Santhi WS, Janam P, Nandakumar K, Pillai MR. Expression of activated transcription factor nuclear factor-kappaB in periodontally diseased tissues. *J Periodontol*. 2005; 76: 1148-53.
2. Andia DC, Nassar CA, Nassar PO, Guimaraes MR, Cerri PS, Spolidorio LC. Treatment with tacrolimus enhances alveolar bone formation and decreases osteoclast number in the maxillae: a histomorphometric and ultrastructural study in rats. *Histol Histopathol*. 2008; 23: 1177-84.
3. Aramburu J, Yaffe MB, Lopez-Rodriguez C, Cantley LC, Hogan PG, Rao A. Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science*. 1999; 285: 2129-33.
4. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003; 423: 337-42.
5. Buchinsky FJ, Ma Y, Mann GN, Rucinski B, Bryer HP, Romero DF, et al. T lymphocytes play a critical role in the development of cyclosporin A-induced osteopenia. *Endocrinology*. 1996; 137: 2278-85.

6. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol.* 2008; 79 Suppl 8: 1569-76.
7. Conboy IM, Manoli D, Mhaikar V, Jones PP. Calcineurin and vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase modulate macrophage effector functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 6324-9.
8. Crabtree GR, Olson EN. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell.* 2002; 109 Suppl: S67-79.
9. Dai W, Dong J, Fang T, Uemura T. Stimulation of osteogenic activity in mesenchymal stem cells by FK506. *J Biomed Mater Res A.* 2008; 86: 235-43.
10. Diestel A, Roessler J, Pohl-Schickinger A, Koster A, Drescher C, Berger F, et al. Specific p38 inhibition in stimulated endothelial cells: a possible new anti-inflammatory strategy after hypothermia and rewarming. *Vascul Pharmacol.* 2009; 51: 246-52.

11. Du S, Hiramatsu N, Hayakawa K, Kasai A, Okamura M, Huang T, et al. Suppression of NF-kappaB by cyclosporin a and tacrolimus (FK506) via induction of the C/EBP family: implication for unfolded protein response. *J Immunol.* 2009; 182: 7201-11.
12. Emingil G, Atilla G, Sorsa T, Luoto H, Kirilmaz L, Baylas H. The effect of adjunctive low-dose doxycycline therapy on clinical parameters and gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels in chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2004; 75: 106-15.
13. Fukunaga J, Yamaai T, Yamachika E, Ishiwari Y, Tsujigiwa H, Sawaki K, et al. Expression of osteoclast differentiation factor and osteoclastogenesis inhibitory factor in rat osteoporosis induced by immunosuppressant FK506. *Bone.* 2004; 34: 425-31.
14. Fukushima H, Jimi E, Okamoto F, Motokawa W, Okabe K. IL-1-induced receptor activator of NF-kappa B ligand in human periodontal ligament cells involves ERK-dependent PGE2 production. *Bone.* 2005; 36: 267-75.

15. Gapski R, Barr JL, Sarment DP, Layher MG, Socransky SS, Giannobile WV. Effect of systemic matrix metalloproteinase inhibition on periodontal wound repair: a proof of concept trial. *J Periodontol.* 2004; 75: 441-52.
16. Garcia de Aquino S, Manzolli Leite FR, Stach-Machado DR, Francisco da Silva JA, Spolidorio LC, Rossa C, Jr. Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. *Life Sci.* 2009; 84: 745-54.
17. Golub LM, Sorsa T, Lee HM, Ciancio S, Sorbi D, Ramamurthy NS, et al. Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 100-9.
18. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2008; 79 Suppl 8: 1585-91.

19. Guimaraes MR, Nassar PO, Andia DC, Nassar CA, Spolidorio DM, Rossa C, Jr., et al. Protective effects of Tacrolimus, a calcineurin inhibitor, in experimental periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 2007; 52: 882-8.
20. Hendrickson BA, Zhang W, Craig RJ, Jin YJ, Bierer BE, Burakoff S, et al. Structural organization of the genes encoding human and murine FK506-binding protein (FKBP) 13 and comparison to FKBP1. *Gene.* 1993; 134: 271-5.
21. Hirotsani H, Tuohy NA, Woo JT, Stern PH, Clipstone NA. The calcineurin/nuclear factor of activated T cells signaling pathway regulates osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *J Biol Chem.* 2004; 279: 13984-92.
22. Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D, et al. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996; 80: S40-5.

23. Hofbauer LC, Shui C, Riggs BL, Dunstan CR, Spelsberg TC, O'Brien T, et al. Effects of immunosuppressants on receptor activator of NF-kappaB ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 280: 334-9.
24. Huang H, Chang EJ, Ryu J, Lee ZH, Lee Y, Kim HH. Induction of c-Fos and NFATc1 during RANKL-stimulated osteoclast differentiation is mediated by the p38 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 351: 99-105.
25. Jennings C, Kusler B, Jones PP. Calcineurin inactivation leads to decreased responsiveness to LPS in macrophages and dendritic cells and protects against LPS-induced toxicity in vivo. *Innate Immun.* 2009; 15: 109-20.
26. Kaminuma O. Selective inhibitors of nuclear factor of activated T cells: potential therapeutic drugs for the treatment of immunological and inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2008; 7: 35-40.

27. Kang YJ, Kusler B, Otsuka M, Hughes M, Suzuki N, Suzuki S, et al. Calcineurin negatively regulates TLR-mediated activation pathways. *J Immunol.* 2007; 179: 4598-607.
28. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol.* 2006; 169: 987-98.
29. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 2001; 142: 5050-5.
30. Kikuchi T, Matsuguchi T, Tsuboi N, Mitani A, Tanaka S, Matsuoka M, et al. Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. *J Immunol.* 2001; 166: 3574-9.
31. Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot (Tokyo).* 1987; 40: 1249-55.

32. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo)*. 1987; 40: 1256-65.
33. Kirkwood KL, Li F, Rogers JE, Otremba J, Coatney DD, Kreider JM, et al. A p38alpha selective mitogen-activated protein kinase inhibitor prevents periodontal bone loss. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007; 320: 56-63.
34. Komarova SV, Pilkington MF, Weidema AF, Dixon SJ, Sims SM. RANK ligand-induced elevation of cytosolic Ca<sup>2+</sup> accelerates nuclear translocation of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *J Biol Chem*. 2003; 278: 8286-93.
35. Matsumoto M, Sudo T, Saito T, Osada H, Tsujimoto M. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL). *J Biol Chem*. 2000; 275: 31155-61.

36. Migita K, Miyashita T, Maeda Y, Aoyagi T, Kawabe Y, Nakamura M, et al. FK506 suppresses the stimulation of matrix metalloproteinase 13 synthesis by interleukin-1beta in rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunol Lett.* 2005; 98: 194-9.
37. Mitsuyama H, Kambe F, Murakami R, Cao X, Ishiguro N, Seo H. Calcium signaling pathway involving calcineurin regulates interleukin-8 gene expression through activation of NF-kappaB in human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res.* 2004; 19: 671-9.
38. Miyazaki M, Fujikawa Y, Takita C, Tsumura H. Tacrolimus and cyclosporine A inhibit human osteoclast formation via targeting the calcineurin-dependent NFAT pathway and an activation pathway for c-Jun or MITF in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2007; 26: 231-9.
39. Morris JC, Waldmann TA. Advances in interleukin 2 receptor targeted treatment. *Ann Rheum Dis.* 2000; 59 Suppl 1: i109-14.

40. Nassar CA, Nassar PO, Abi Rached RS, Holzhausen M, Marcantonio E, Jr., Spolidorio LC. Effect of cyclosporin A on alveolar bone homeostasis in a rat periodontitis model. *J Periodontal Res.* 2004; 39: 143-8.
41. Nassar CA, Nassar PO, Andia DC, Guimaraes MR, Spolidorio LC. Effects of long-term FK 506 therapy on the alveolar bone and cementum of rats. *Transplant Proc.* 2009; 41: 1871-4.
42. Nelson BH. IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *J Immunol.* 2004; 172: 3983-8.
43. Okahashi N, Inaba H, Nakagawa I, Yamamura T, Kuboniwa M, Nakayama K, et al. Porphyromonas gingivalis induces receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblasts through the activator protein 1 pathway. *Infect Immun.* 2004; 72: 1706-14.
44. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol.* 1997; 15: 707-47.

45. Rogers JE, Li F, Coatney DD, Otremba J, Kriegl JM, Protter TA, et al. A p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor arrests active alveolar bone loss in a rat periodontitis model. *J Periodontol.* 2007; 78: 1992-8.
46. Rossa C, Ehmann K, Liu M, Patil C, Kirkwood KL. MKK3/6-p38 MAPK signaling is required for IL-1beta and TNF-alpha-induced RANKL expression in bone marrow stromal cells. *J Interferon Cytokine Res.* 2006; 26: 719-29.
47. Rossa C, Jr., Liu M, Kirkwood KL. A dominant function of p38 mitogen-activated protein kinase signaling in receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression and osteoclastogenesis induction by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J Periodontal Res.* 2008; 43: 201-11.
48. Sanchez-Perez I, Rodriguez-Hernandez CJ, Manguan-Garcia C, Torres A, Perona R, Murguia JR. FK506 sensitizes mammalian cells to high osmolarity by modulating p38 MAP kinase activation. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61: 700-8.

49. Sartori R, Li F, Kirkwood KL. MAP kinase phosphatase-1 protects against inflammatory bone loss. *J Dent Res.* 2009; 88: 1125-30.
50. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J.* 2007; 21: 325-32.
51. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontol Scand.* 2001; 59: 167-73.
52. Spolidorio LC, Nassar PO, Nassar CA, Spolidorio DM, Muscara MN. Conversion of immunosuppressive monotherapy from cyclosporin a to tacrolimus reverses bone loss in rats. *Calcif Tissue Int.* 2007; 81: 114-23.
53. Spolidorio LC, Spolidorio DM, Holzhausen M. Effects of long-term cyclosporin therapy on the periodontium of rats. *J Periodontal Res.* 2004; 39: 257-62.

54. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev.* 1999; 20: 345-57.
55. Suematsu A, Tajiri Y, Nakashima T, Taka J, Ochi S, Oda H, et al. Scientific basis for the efficacy of combined use of antirheumatic drugs against bone destruction in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2007; 17: 17-23.
56. Takami M, Cho ES, Lee SY, Kamijo R, Yim M. Phosphodiesterase inhibitors stimulate osteoclast formation via TRANCE/RANKL expression in osteoblasts: possible involvement of ERK and p38 MAPK pathways. *FEBS Lett.* 2005; 579: 832-8.
57. Takami M, Takahashi N, Udagawa N, Miyaura C, Suda K, Woo JT, et al. Intracellular calcium and protein kinase C mediate expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in osteoblasts. *Endocrinology.* 2000; 141: 4711-9.

58. Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med.* 2005; 83: 170-9.
59. Tanaka S, Nakamura K, Takahashi N, Suda T. Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutics targeting the RANKL-RANK signaling system. *Immunol Rev.* 2005; 208: 30-49.
60. Taubman MA, Stoufi ED, Ebersole JL, Smith DJ. Phenotypic studies of cells from periodontal disease tissues. *J Periodontal Res.* 1984; 19: 587-90.
61. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science.* 2000; 289: 1504-8.
62. van Lierop PP, de Haar C, Lindenbergh-Kortleve DJ, Simons-Oosterhuis Y, van Rijt LS, Lambrecht BN, et al. T-cell regulation of neutrophil infiltrate at the early stages of a murine colitis model. *Inflamm Bowel Dis.* 2010; 16: 442-51.

63. Varanasi SS, Datta HK. Characterisation of cytosolic FK506 binding protein 12 and its role in modulating expression of Cbfa1 and osterix in ROS 17/2.8 cells. *Bone*. 2005; 36: 243-53.
64. Wada N, Maeda H, Yoshimine Y, Akamine A. Lipopolysaccharide stimulates expression of osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappa B ligand in periodontal ligament fibroblasts through the induction of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *Bone*. 2004; 35: 629-35.
65. Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J, et al. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol*. 2006; 24: 33-63.
66. Zhang D, Yang YQ, Li XT, Fu MK. The expression of osteoprotegerin and the receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in human periodontal ligament cells cultured with and without 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Arch Oral Biol*. 2004; 49: 71-6.

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

Araraquara, 31 de março de 2010

RAFAEL SARTORI