**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

CARLOS EDUARDO PALANCH REPEKE

**Cinética de expressão de moléculas co-estimulatórias de
osteoclastos no desenvolvimento da doença periodontal
experimental e sua modulação por citocinas**

**BAURU
2012**

CARLOS EDUARDO PALANCH REPEKE

**Cinética de expressão de moléculas co-estimulatórias de
osteoclastos no desenvolvimento da doença periodontal
experimental e sua modulação por citocinas**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de
Bauru da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências no
Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas,
na área de concentração Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Versão corrigida

BAURU

2012

Repeke, Carlos Eduardo Palanch

R299c Cinética de expressão de moléculas co-estimulatórias de osteoclastos no desenvolvimento da doença periodontal experimental e sua modulação por citocinas / Carlos Eduardo Palanch Repeke. – Bauru, 2012.

117p. : il. ; 30cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente pra fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data:

Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB-USP

Protocolo nº: 022/2008

Data: 07/04/2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

Claudemir, Marisa, Henrique Repeke e Daiana Broll

Minha família Δ Meu porto seguro

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao ***Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet***

por ser um grande amigo e grande orientador.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis** (Histologia FOB/USP), pelo aprendizado, convivência, amizade, ajuda e gentileza.

Ao **Prof. Dr. Rumio Taga** (Histologia FOB/USP), pela sabedoria e dedicação de um verdadeiro mestre.

À **Dra. Elcia Maria Varizze Silveira** e família, pela amizade, colaboração e convívio durante tantos anos.

À **Dra. Gabriela Gennaro**, a qual respeito muito como amiga e profissional.

À doutoranda **Andreia Espíndola** e seu marido **Francisnei**, pela amizade e parceria harmônica que perdurará por muito tempo.

Ao doutorando **Ricardo Arantes**, um grande amigo ao qual reconheço grandes qualidades.

À **Dra. Tânia Mary Cestari, Patrícia Germino, Danielle Ceolin e Teresa Afms**, vocês são as almas do laboratório de histologia, responsáveis por toda harmonia e sucesso do mesmo.

À equipe de pesquisadores do laboratório de histologia: **Dra Camila Rodini, Bruna Bigueti, Ana Cláudia Araújo-Pires, Cláudia Cristina Bigueti, Bruno Viscelli, Carol Francisconi, Tamiris Vallim, Carol Rocha, Reinaldo Valério Germino, Marcela Claudino, Samuel Ferreira Jr, Andreza Aranha** e alunos de iniciação científica. Muito obrigado.

Ao laboratório de Microbiologia e Imunologia FOB/USP sob tutela da **Dra. Ana Paula Campanelli** e integrantes: **Thaís Gasparoto, Hayana Ramos, Carine Oliveira, Cláudia, André e Dalva**.

Aos professores da PUC-PR, representados pelo **Prof. Dr. Luiz Fernando Pereira** e **Profa. Dra. Paula Trevillato**, fonte de inspiração e incentivo.

À **Dra. Ana Paula Trombone** e **Dr. Thiago Garlet** pela parceria em diversos artigos científicos e capítulos de livros.

À equipe de corrida USP/Bauru: sob orientação dos professores **Alexandre Carrara** e **Alexandre Sassaki** além de **Tadeu, Ovídio, Nilton (Mirtiça), Elói, Rubão, Marcelo Momesso, Carlos Baiano, Murilo Sales, Mauricio, Maria Inês, Raíssa, Dani, André Shinohara, Nilceu, João Paulo e Cesão**. Amizade se faz correndo.

Aos Atletas e amigos da Iron Coach - Bauru: sob orientação dos professores **Vitor Carrara** e **Walter Moura** e participação de **José Roberto Junior**, **Zézinho**, **Cássio**, **Mauri**, **Ataualpa (Tato)**, **Bruno**, **Joyce**, **Pedro**, **Marília**, **Clara**, **Gerson**, **Valéria**, **Maria Cláudia**, **Karina**, **Francisco Klotz**, **Francisco Freitas**, **Biu**, **João**, **Adriana**, **Lucianão**, **Paula**, **Bernardo**, **Kanú**, **Thiago Franco**, **Marcio Castorino**, etc. A cada desafio uma conquista em equipe, obrigado. Estendo os agradecimentos ao **time Nadart-Bauru**.

Aos amigos do HRAC/USP, **Cauê Cardoso**, **Naiara Jordão**, **Túlio Lara**, **Adriano Brust**, **Lia Montagnolli**, **Gustavo Ohira**, **Eduardo Muncinelli**, **Guilherme Henrique**, **Guilherme Moreira**, **Patrick Alves**, **Tayná Tavares**, **Bruno Nicolielo**, **Mariana**, **Stefania**, **Carlos Bueno**, **Júlia** e **Dilton**.

A todos os funcionários USP-Bauru, aqui representados por **Hugo Leonardo**, **José Carlos**, **Clodoaldo de Góes**, **Aldivina** e **Elizabete de Jesus**.

Ao **Erivan Ramos Jr**, por ser meu grande amigo e mentor em todas as horas. Estendo também meu agradecimento a sua companheira **Ana Carolina Morandini**.

Aos irmãos **João Paulo** e **Humberto Schwartz**, pela grande amizade, suporte, ensinamentos e por dividir durante anos um apartamento modesto, porém animado.

Ao meu amigo **Bruno D'Aurea Furquim**, ao qual a competência se iguala ao caráter.

To **Farooque Ahmed**, thanks for share the apartment with me during almost one year, I really wanna keep in touch with you in the future.

Aos familiares, **Iracy Palanch**, **Lilian**, **Carlos**, **André**, **Gabriel** e **Gabriela**; **Cidinha Répeke**, **Edgar**, **Renata**, **Juliana** e **Otávio**; **Drica** e **Nina**; **Marília Conceição**, **Naiara**, **Angélica** e **Roni** e **Família Vanin**.

A todos os meus amigos pessoais aqui representados por: **Anthon**, **Raul**, **Pedrinho** e **Caio Salvatore** e família, **Rafael "Bro"**, **Francisco Fronza**, **Fernando Koike**, família **Lucon**, família **Jungles**, **Geraldo Salvador** e família, dentre tantos outros.

E a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP**; (processo n° 2008/11174-1) pelo fundamental suporte através de bolsa de doutorado e pelo suporte durante toda minha carreira de Pós-graduação.

Ao **Departamento de Histologia da Faculdade de Odontologia de Bauru**; por muitos anos de trabalho harmônico e acolhimento.

À instituição **Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB) - USP** representada por todos os seus professores e funcionários.

À instituição **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) - USP**, em especial ao Departamento de Bioquímica e Imunologia.

"The Osteoclast"

"Over him hung a form which I cannot find words to describe: gigantic in stature, yet uncouth and distorted in its proportions. As he hung over the coffin, his face was concealed by long locks of ragged hair; but one vast hand was extended, in colour and apparent texture like that of a mummy. when he heard the sound of my approach, he ceased to utter exclamations of grief and horror, and sprung towards the window. Never did I behold a vision so horrible as his face, of such loathsome, yet appalling hideousness. I shut my eyes, involuntarily, and endeavoured to recollect what were my duties with regard to this destroyer."

Trecho retirado do livro "Frankenstein: or, The modern Prometheus" - 1823.

Mary Wollstonecraft Shelley

RESUMO

O processo de diferenciação e ativação de osteoclastos, essencial para a manutenção da homeostasia do tecido ósseo e também envolvido na patogênese de diversas patologias caracterizadas pela atividade osteolítica, depende de um sistema central de controle que envolve a ligação das moléculas RANK/RANKL. Além do sistema RANK/RANKL, moléculas co-estimulatórias de osteoclastos, tais como os complexos DAP-12, TREM-2 e SIRP β 1, e FcR γ , OSCAR e PIR-A, também apresentam um papel importante na geração e ativação de osteoclastos. Entretanto, a possível contribuição de tais moléculas para a progressão da doença periodontal (DP) permanece desconhecida, assim como o possível impacto de citocinas na modulação de sua expressão no microambiente periodontal. Nosso objetivo foi investigar, por *RealTime*PCR, o padrão de expressão de moléculas co-estimulatórias de osteoclastos (DAP-12, TREM-2 e SIRP β 1, e FcR γ , OSCAR e PIR-A) na periodontite crônica em humanos, além de avaliar a cinética de expressão destas moléculas e a sua modulação por citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-17 e IL-10) ao longo do curso da DP em camundongos em camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e geneticamente modificados (TNFp55KO, IFN γ KO, IL17KO, IL10KO. Nossos resultados demonstram que nas lesões periodontais crônicas a expressão de todas as moléculas co-estimulatórias de osteoclastos apresentaram-se significativamente aumentadas quando comparadas às amostras controle. Com relação à periodontite experimental, verificamos que todas as moléculas co-estimulatórias alvo apresentavam aumento em sua expressão após a indução de doença quando comparado aos controles. Nos camundongos para TNFp55KO, IFN γ KO e IL17KO, observamos uma redução na severidade da DP (reabsorção óssea e quantidade de células inflamatórias) e na expressão de moléculas co-estimulatórias, ao contrário do observado nos camundongos IL10KO. Entretanto, ao normalizarmos os níveis de expressão das moléculas co-estimulatórias de osteoclastos pelo número de células inflamatórias, verificamos que TNF- α e IL-17 se mostram associados a uma maior expressão de moléculas co-estimulatórias, enquanto IFN- γ e IL-10 parecem regular negativamente a expressão de tais moléculas. Em termos gerais, demonstramos que a expressão de moléculas co-estimulatórias de osteoclastos se mostra aumentada na DP humana e experimental, e que citocinas parecem modular sua expressão por mecanismos diretos e indiretos, tais como a migração de células inflamatórias para os sítios de doença periodontal.

Palavras-chave: Moléculas co-estimulatórias de osteoclasto. Citocinas. Doença periodontal. Osteoclastogênese.

ABSTRACT

Kinetics of osteoclast co-stimulatory molecules throughout experimental periodontitis and mice and its modulation by cytokines

The osteoclast differentiation and activation are essential to bone tissue homeostasis and in the development of bone pathologies, which RANK/RANKL signaling molecules are the major osteoclastogenic factor. However, osteoclast co-stimulatory molecules, such as DAP-12, TREM-2, SIRP β 1, FcR γ , OSCAR and PIR-A, also present an important role in the osteoclastogenesis. However, the exact role and regulation of these molecules in human and mice periodontal diseases (PD) development have not completely known. Our aim was to investigate the pattern of osteoclast co-stimulatory expression (DAP-12, TREM-2, SIRP β 1, FcR γ , OSCAR and PIR-A) in human chronic periodontitis (CP), apart from analyze the kinetic of these molecules and their regulation by cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-17 and IL-10) in the development of experimental periodontal disease in mice C57Bl/6 and knockout. Our results demonstrated that all osteoclast co-stimulatory molecules presented highly expressed in CP patients when compared with control. Similar results are presented about experimental PD, where all co-stimulatory molecules was presented highly expressed in infected mice when compared with control mice. We observed in TNFp55KO, IFN γ KO and IL17KO mice a decrease in PD scores and co-stimulatory molecules expression, the opposite of IL10KO mice. However, when we standardized the co-stimulatory molecules levels by the number of inflammatory cells, we found that TNF- α and IL-17 are associated with increased expression of co-stimulatory molecules, while IFN- γ and IL-10 appear to negatively regulate the expression of such molecules. In conclusion, we demonstrated that osteoclast co-stimulatory molecules shown increased in human and experimental PD, and cytokines appear to modulate their expression by direct and indirect mechanisms, such as inflammatory cells migration to the PD infected tissue.

Keywords: Osteoclast co-stimulatory Molecules. Cytokines. Periodontal diseases. Osteoclastogenesis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	15
2	PROPOSIÇÃO	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	SELEÇÃO DOS PACIENTES E COLETA DE AMOSTRAS	31
3.2	ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	31
3.3	PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE DOENÇA PERIODONTAL	32
3.4	COLETA DE AMOSTRAS	33
3.5	AVALIAÇÃO DA REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR	33
3.6	ANÁLISE QUANTITATIVA DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO	34
3.7	EXTRAÇÃO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA	35
3.8	REAÇÕES DE REAL TIME PCR	36
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4	RESULTADOS	39
4.1	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS DE OSTEOCLASTOS EM HUMANOS COM DOENÇA PERIODONTAL	41
4.2	CINÉTICA DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E DE REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS WT INFECTADOS POR <i>A.a.</i>	43
4.3	ANÁLISE FENOTÍPICA DAS CÉLULAS INFLAMATÓRIAS EXTRAÍDAS DOS TECIDOS PERIODONTAIS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>A.a.</i>	44
4.4	CINÉTICA DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS CCR2+, CCR5+ E CCR4+ PARA OS TECIDOS PERIODONTAIS DE CAMUNDONGOS WT INFECTADOS COM <i>A.a.</i>	47
4.5	CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES OSTEOCLASTOGÊNICOS NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR <i>A.a.</i>	48
4.6	ANÁLISE DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS DE OSTEOCLASTOS NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR <i>A.a.</i>	50

4.7	ANÁLISE DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS PRÓ- E ANTI- INFLAMATÓRIAS NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR <i>A.a.</i>	55
4.8	PAPEL DA CITOCINA TNF- α NA CINÉTICA DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E DE REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR <i>A.a.</i>	56
4.9	INFLUENCIA DA CITOCINA TNF- α NA MODULAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS DE OSTEOCLASTOS NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR <i>A.a.</i>	58
4.10	PAPEL DA CITOCINA IFN- γ NA CINÉTICA DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E DE REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR <i>A.a.</i>	60
4.11	INFLUENCIA DA CITOCINA IFN- γ NA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS DE OSTEOCLASTOS NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR <i>A.a.</i>	62
4.12	PAPEL DA CITOCINA IL-17 NA MODULAÇÃO DA CINÉTICA DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E DE REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR <i>A.a.</i>	64
4.13	INFLUENCIA DA CITOCINA IL-17 NA MODULAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS DE OSTEOCLASTOS NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR <i>A.a.</i>	65
4.14	PAPEL DA CITOCINA ANTI-INFLAMATÓRIA IL-10 NA CINÉTICA DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E DE REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR <i>A.a.</i>	66
4.15	INFLUENCIA DA CITOCINA ANTI-INFLAMATÓRIA IL-10 NA MODULAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS DE OSTEOCLASTOS NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR <i>A.a.</i>	68
4.16	RELAÇÃO ENTRE AS RAZÕES DAS MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS E DAS CÉLULAS INFLAMATÓRIAS NAS DIVERSAS LINHAGENS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS POR <i>A.a.</i>	69

5	DISCUSSÃO	75
6	CONCLUSÕES	95
	REFERÊNCIAS	99
	APÊNDICES	111
	ANEXO	115

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Recentemente a osteoimunologia, uma nova ramificação da imunologia que estuda a relação entre a resposta imune e o sistema ósseo, vem atraindo muita atenção pela destruição óssea causada por uma anormal ativação do sistema imunológico em diferentes condições patológicas (ARRON; CHOI, 2000; JIMI; GHOSH, 2005; TAKAYANAGI, 2005). Moléculas regulatórias, incluindo citocinas, receptores e fatores de transcrição, são comuns entre os dois sistemas e podem ser a chave para o entendimento de diversas doenças inflamatórias, que tem como aspecto clínico importante a reabsorção óssea (TAKAYANAGI, 2005; HAN; KAWAI; TAUBMAN, 2007). As doenças periodontais (DPs) são exemplos de patologia cuja evolução é influenciada pela resposta inflamatória e imunológica do hospedeiro, envolvendo a participação de diversos tipos celulares que atuam no microambiente local e modulam a resposta do hospedeiro em busca do controle da infecção. Uma resposta imunológica exacerbada frente ao constante desafio bacteriano no tecido periodontal, embora teoricamente protetora no contexto infeccioso, resulta no desenvolvimento da doença, acarretando a perda da inserção tecidual, reabsorção óssea alveolar e a eventual perda de elementos dentais (LOESCHE, 1993; TENG, 2003).

Um dos mecanismos chave envolvidos na patogênese de doenças inflamatórias que envolvem o sistema ósseo, parece envolver a formação e a ativação descontrolada de osteoclastos, que por definição são células gigantes multinucleadas, de origem hematopoiética, responsáveis pela reabsorção óssea. O desenvolvimento dos osteoclastos depende de uma molécula fundamental chamada RANKL (ligante do receptor de ativação do fator nuclear κ B) que ao se ligar ao receptor RANK (receptor de ativação do fator nuclear κ B), presente em células hematopoiéticas precursoras de osteoclastos, desencadeia uma cascata de sinalização ativando diversos fatores de transcrição responsáveis pela diferenciação e ativação dos pré-osteoclastos (DUCY et al., 1997; JIMI; GHOSH, 2005; TAKAYANAGI, 2005). O principal fator de transcrição na osteoclastogênese é o NFATc1 (fator nuclear de ativação de células T c1), um membro da família NFAT (fator nuclear de ativação de células T), originalmente descoberto no contexto da

ativação das células T e também envolvido na função e desenvolvimento de diversas células (KIM et al., 2005; TAKAYANAGI, 2005; TAKAYANAGI, 2007). Apesar do NFATc1 ser induzido por RANKL e ser capaz de gerar um loop de autoamplificação, podendo ser auto regulável, esse fator de transcrição, como todos da família NFAT, depende de um aumento na concentração de cálcio intracelular que pode ser causado pela ativação da via de sinalização cálcio/calcineurina (RAO; LUO; HOGAN, 1997; BERRIDGE; LIPP; BOOTMAN, 2000; TAKAYANAGI, 2005). Uma vez que RANKL não é um ativador da via cálcio/calcineurina, pode-se concluir que, apesar de RANKL ser o principal indutor da osteoclastogênese, a ligação RANK/RANKL não é a única necessária.

De fato, estudos demonstram que a diferenciação de osteoclastos *in vitro* é severamente inibida na ausência de DAP-12 (DNAX-activating protein 12), uma molécula adaptadora de membrana que contém um *motif* ITAM (*motif* de ativação de imunoreceptor baseado em tirosina) que ativa a sinalização de cálcio em células do sistema imunológico (KAIFU et al., 2003; KOGA et al., 2004). Diferentemente de ensaios *in vitro*, camundongos deficientes de DAP-12 (DAP12-KO) exibem uma leve osteopetrose e contém um numero normal de osteoclastos no tecido ósseo, sugerindo que apesar de DAP-12 ter um papel crítico na osteoclastogênese *in vitro*, outras moléculas podem substituí-la *in vivo* (KAIFU et al., 2003). Alternativamente, a molécula FcR γ (cadeia gamma de receptores Fc) também possui um *motif* TAM que sinaliza a mesma via cálcio/calcineurina, e dessa forma poderia compensar a falta de DAP-12. De fato, das proteínas que contém o *motif* ITAM, FcR γ é a mais expressa em pré-osteoclastos (MOCSAI et al., 2004). Em camundongos deficientes das duas moléculas (DAP12-KO/FcR γ -KO), observa-se uma severa osteopetrose devido a uma perda efetiva na diferenciação de osteoclastos, evidenciando que a sinalização ITAM via uma dessas moléculas (DAP-12 e FcR γ) é indispensável para no programa de diferenciação de osteoclastos (MOCSAI et al., 2004).

DAP-12 e FcR γ são proteínas transmembrana formadas como homodímeros, porém, tais moléculas não apresentam domínios de ligação extracelular, tendo assim que se associarem a receptores na superfície da célula para que o processo de sinalização possa ser disparado. Para tanto, DAP-12 se associa a TREM-2 (*triggering receptor expressed in myeloid cells*) e SIRP β 1 (proteína de sinal regulatório β 1), enquanto FcR γ se associa a OSCAR (receptor

associado a osteoclasto) e PIR-A (*paired Ig-like receptor-A*) (TAKAYANAGI; 2005; HUMPHREY et al., 2006). Diversos estudos mostram que essas proteínas, chamadas de moléculas co-estimulatórias de RANK ou moléculas co-estimulatórias de osteoclastos, desempenham papéis indispensáveis para a osteoclastogênese e vêm sendo inseridas em um contexto de ativação patológicas dos osteoclastos em doenças inflamatórias (Fig. 1).

Figura 1 - RANKL e sinalização de moléculas co-estimulatórias na diferenciação de osteoclastos. A sinalização das moléculas co-estimulatórias FcRγ, OSCAR e PIR-A e/ou DAP-12, TREM-2, SIRPB1, por um ligante ainda desconhecido, ativa a cascata e sinalização de Ca^{2+} , a qual é fundamental para a indução de NFATc1. A indução de NFATc1 também depende de TRAF6 e c-Fos, os quais são ativados por RANKL. Figura modificada de Koga et al. (2004) e Takayanagi (2005).

Os níveis de expressão de PIR-A, receptor associado à molécula adaptadora FcRγ se mostram significativamente aumentados em células sinoviais de pacientes portadores de artrite reumatóide (RA) (TEDLA et al., 2002), uma patologia com um padrão de resposta imunológica semelhante ao da doença periodontal (BARTOLD; MARSHALL; HAYNES, 2005). Igualmente, a expressão do receptor OSCAR apresenta-se aumentada em monócitos de pacientes com RA quando comparados com pacientes do grupo controle (HERMAN et al., 2008), além de alterações genéticas em OSCAR estarem associadas ao aumento no risco de osteoporose pós-menopausa (KIM et al., 2005). Assim como receptores associados à molécula adaptadora DAP-12, como é o caso de TREM-2, apresentam mutações em seu gene associado a uma doença que afeta o tecido ósseo, a doença de Nasu-Hakola (KONDO et al., 2002). Apesar das associações, o papel individual ao qual

cada molécula co-estimulatória apresenta nas diversas doenças ósseas ainda é motivo de dúvida.

Da mesma forma, ainda permanece obscura a relação entre as moléculas co-estimulatórias de osteoclastos e seus ligantes. Aparentemente, a interação entre supostos pré-osteoclastos e uma camada de fibras colágenas aderidas a superfície óssea onde se encontram células da mesma linhagem que osteoblastos, de alguma forma desencadearia a ativação da via cálcio/calcineurina. De fato, o receptor OSCAR parece ser ativado por fibras colágenas em disposição de tripla hélice, porém, as outras moléculas co-estimulatórias parecem não responder da mesma forma, permanecendo a necessidade de mais estudos em relação à ativação de tais moléculas (BARROW et al., 2011). Mesmo ativadas, para que as moléculas co-estimulatórias desencadeiem o aumento do nível de cálcio intracelular, uma série de fatores são necessários. Proteínas intracelulares, como é o caso de SHIP-1 (domínio SH2 contendo fosfatase inositol-1) e moléculas responsáveis por fosforilar SHIP1, como DOK3 (proteína Docking 3), regulam de forma negativa a osteoclastogênese através da inibição da sinalização intracelular via *motif* ITAM presentes em células pré-osteoclásticas (SENIS et al., 2009; PENG et al., 2010).

Outro motivo de discussão é o fenótipo final da célula que irá se diferenciar em osteoclasto. É bem determinado que osteoclastos são células multinucleadas, da linhagem monócito/macrófago, e positivas para RANK, moléculas co-estimulatórias de osteoclastos e CD115 (receptor de M-CSF [fator estimulador de monócitos/macrófagos]). Porém, não se sabe ao certo se *in vivo* a diferenciação se dá através de macrófagos, monócitos ou outro tipo de célula da mesma linhagem. A complexidade do fenótipo das células que se diferenciarão em osteoclastos aumenta ainda mais quando observamos estudos *in vitro*, onde de acordo com o estímulo oferecido na cultura celular pode-se diferenciar diversos tipos de células, como monócitos, macrófagos e células dendríticas, em osteoclastos, o que pode não acontecer em uma situação patológica *in vivo* (CHIU et al., 2012; PIRRACO; REIS; MARQUES, 2012).

Realmente, ao analisarmos o ambiente inflamatório de uma patologia óssea, observamos diversos mediadores que podem influenciar não só na diferenciação celular, como em diversas moléculas que atuam na modulação desta patologia. Com a osteoclastogênese não é diferente, assim, apesar das associações

com patologias ósseas inflamatórias, pouco se sabe como a expressão das moléculas co-estimulatórias de osteoclastos são moduladas. Sabe-se que citocinas que estão abundantemente expressas em tais doenças, e que direta ou indiretamente fazem parte de eventos osteoclastogênicos, e também podem atuar de alguma forma na regulação da expressão destas moléculas co-estimulatórias (BARTOLD; MARSHALL; HAYNES, 2005; GARLET et al., 2006; HERMAN et al., 2008). Uma delas é o TNF- α (fator de necrose tumoral- α), uma citocina pró-inflamatória clássica altamente expressa em doenças como artrite reumatóide e DP, e que tem papel importante na reabsorção óssea (GRAVES; COCHRAN, 2003; GARLET et al., 2007; DAVIES et al., 2008). Realmente, um estudo de nosso grupo de pesquisa utilizando modelo experimental de doença periodontal em camundongos, realizado em camundongos deficientes do receptor de TNF- α p55, a reabsorção óssea alveolar, assim como a severidade da doença, mostraram-se significativamente reduzidas (GARLET et al., 2007). Além do mais, TNF- α parece induzir a expressão de OSCAR em monócitos, que poderia ser um fator adicional responsável pela capacidade desta citocina mediar a reabsorção óssea inflamatória (HERMAN et al., 2008; KIM et al., 2008). TNF- α também tem a capacidade aumentar a expressão de RANKL, além de mediar a osteoclastogênese através da citocina IL-1 (interleucina-1), aumentando a expressão, não só da própria IL-1, como também de seu receptor IL-1RI (WEI et al., 2005).

Similar ao TNF- α , o IFN- γ (Interferon- γ) é uma citocina pró-inflamatória que está presente em altos níveis nos tecidos gengivais com doença periodontal, e está associada com a progressão das lesões e o aumento da severidade desta doença (REF). De fato, estudos em camundongos claramente demonstram que IFN- γ está envolvido no desenvolvimento da reação inflamatória e na reabsorção óssea na DP experimental (GARLET et al., 2008). Além de sua atividade inflamatória, IFN- γ é a citocina predominante de respostas imunes polarizadas do tipo Th1, que apresentam como características principais a ativação de fagócitos e o estímulo para produção de outras citocinas e quimiocinas inflamatórias. Além do mais, IFN- γ contribui tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa, apresentando um papel fundamental na resposta do organismo ao ataque de patógenos (SCHRODER et al., 2004; GARLET et al., 2008). Estudos demonstram uma controvérsia no papel do IFN- γ na reabsorção óssea, uma vez que *in vitro* tal citocina se mostra inibidora

da diferenciação e ativação de osteoclastos, enquanto *in vivo* sua ausência resulta em atenuação da reabsorção óssea inflamatória (FOX; CHAMBERS, 2000; GARLET et al., 2008), sugerindo um papel importante e complexo para tal mediador no controle da diferenciação e ativação de osteoclastos, e colocando IFN- γ como potencial modulador da expressão das moléculas co-estimulatórias de osteoclastos.

Além das moléculas inflamatórias clássicas como TNF- α , e de citocinas Th1 como IFN- γ , estudos recentes também demonstram que há uma participação importante de IL-17 no desenvolvimento da DP (JOHNSON; WOOD; SERIO, 2004; TAKAHASHI et al., 2005; YU et al., 2008). IL-17 é o principal produto de células T polarizadas com o fenótipo Th17, caracteristicamente células Th17 apresentam uma expressão de RANKL em sua superfície superior a células Th1 e vêm sendo muito relacionada à perda óssea em doenças inflamatórias (SATO, 2008). IL-17 é uma citocina produzida principalmente por células Th 17 e que é considerado um regulador positivo da expressão de citocinas pró-inflamatórias e RANKL em diversos tipos de células (KRAMER; GAFFEN, 2007). Interessantemente, IL-17 parece ser diretamente um indutor menos potente de fatores osteoclastogênicos quando comparados com TNF- α e IL-1 β , porém IL-17 é capaz de induzir a expressão de TNF- α e IL-1 β gerando um loop de amplificação inflamatório, o qual consequentemente aumenta a expressão de RANKL (BEKLEN et al., 2007; TROMBONE et al., in press). Além do mais IL-17 tem sido detectada no fluido crevicular e em tecidos gengivais com doença periodontal, e tem demonstrado ter um importante papel na progressão da inflamação óssea (BEKLEN et al., 2007; YU et al., 2007).

Contrariamente às citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ e IL-17), IL-10, uma citocina primariamente imunossupressora (MENEZES et al., 2008), parece inibir a expressão de RANKL em células T do sangue periférico de humanos (MOHAMED et al., 2007). Estudos mostram uma correlação negativa entre IL-10 e a concentração de RANKL solúvel em tecidos gengivais (ERNST et al., 2007). Além disso, IL-10 também é capaz de aumentar a produção de osteoprotegerina (OPG), um receptor *decoy* de RANK que ao se ligar a RANKL evita a ligação RANK/RANKL fundamental para a osteoclastogênese (TAKAYANAGI, 2005). Assim como as citocinas pró-inflamatórias citadas, IL-10 apresenta uma expressão elevada em pacientes com doença periodontal crônica, estando associada à atenuação da

doença. (ERNST et al., 2007; HAN; KAWAI; TAUBMAN, 2007; CLAUDINO et al., 2008). IL-10, assim como as moléculas co-estimulatórias, atua diretamente em precursores de osteoclastos, porém de uma forma inversa (MOHAMED et al., 2007). IL-10 inibe a diferenciação e ativação dos osteoclastos, aumentando a produção de SOCS (supressores de sinalização de citocinas), que atua inibindo a ativação de fatores de transcrição que entram na cascata de sinalização de NFATc1 (MENEZES et al., 2008). Fazendo assim com que IL-10 se apresente como um alvo em potencial na modulação da expressão das moléculas co-estimulatórias.

Apesar do indiscutível papel das citocinas na osteoclastogênese e no desenvolvimento da doença periodontal, não se sabe realmente qual o mecanismo ou o grau de interferência delas na expressão das moléculas co-estimulatórias de osteoclastos, e qual a relação destas com a progressão da doença periodontal experimental. Analisar tais interferências dentro da doença periodontal humana e correlacioná-los com o estado clínico dos pacientes é um processo complexo: diferenças com relação à composição da microbiota periodontal relacionada à doença, época de estabelecimento, severidade e progressão da doença, influência genética, condições sistêmicas e ambientais, dificultam o estabelecimento direto de uma relação de causa e efeito.

Visando facilitar o estudo da osteoimunologia das doenças periodontais, modelos animais têm sido utilizados com sucesso, uma vez que tais variáveis podem ser controladas ou minimizadas, possibilitando a análise individual do papel de determinadas citocinas induzidas por possíveis periodontopatógenos e de fatores osteoclastogênicos dentro da resposta do hospedeiro (GENCO; VAN DYKE; AMAR, 1998). Modelos utilizando camundongos apresentam vantagens como, a ocorrência natural da doença em determinadas espécies, com prevalência e características comparáveis à doença humana, além da suscetibilidade à indução experimental de doença periodontal (GARRED et al., 1998; WIEBE et al., 2001). Além disso, camundongos apresentam custos relativamente baixos, são de fácil manejo e os processos inflamatórios e imunológicos são extensamente estudados e bem delineados. Seu *background* genético é conhecido e manipulável, permitindo que aspectos muito bem definidos possam ser avaliados de maneira precisa, com o emprego de animais geneticamente modificados, substâncias bloqueadoras ou antagonistas, que em sua grande maioria são desenvolvidas experimentalmente em

camundongos (GARRED et al., 1998). O modelo experimental empregado se baseia na inoculação oral de um periodontopatógeno, o *Agreggatibacter actinomycetemcomitans*, considerado por muitos como o agente etiológico principal da periodontite agressiva, além de estar presente em um significativo número de casos de periodontite crônica (HENDERSON et al., 2002; MOMBELLI; CASAGNI; MADIANOS, 2002).

Por fim, tendo em vista nossa experiência no estudo de certos aspectos da imunoregulação das doenças periodontais, assim como o desenvolvimento e implantação do modelo experimental da doença periodontal em camundongos, e baseado nas evidências que apontam para um importante papel das moléculas co-estimulatórias de osteoclastos na imunopatogênese das doenças periodontais, e de sua regulação por diferentes classes de citocinas, acreditamos que os resultados desse estudo certamente serão úteis, não apenas para o entendimento dos mecanismos de diferenciação e ativação de osteoclastos, mas também para ampliar e contribuir o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e de diagnóstico para as doenças periodontais e outras patologias ósseo inflamatórias.

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

Baseado no exposto tem-se como objetivo investigar o padrão de expressão de moléculas co-estimulatórias de osteoclastos (DAP-12, TREM-2 e SIRP β 1, e FcR γ , OSCAR e PIR-A) em pacientes portadores de DP crônica, além de avaliar a cinética de expressão destas moléculas e a sua modulação por citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-17) ao longo do curso da DP experimental em camundongos induzida por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Detalhadamente, os objetivos são:

- analisar a expressão de moléculas co-estimulatórias de osteoclastos (DAP-12 TREM-2 e SIRP β 1; e FcR γ OSCAR e PIR-A) na doença periodontal crônica em humanos;
- estudar a cinética de expressão de moléculas co-estimulatórias relacionadas a DAP-12, TREM-2 e SIRP β 1 na doença periodontal experimental e correlacioná-las com a severidade da doença durante o seu curso;
- estudar a cinética de expressão de moléculas co-estimulatórias relacionadas a FcR γ , OSCAR e PIR-A na doença periodontal experimental e correlacioná-las com a severidade da doença durante o seu curso;
- estudar o papel das citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-17 e IL-10) na modulação da expressão de moléculas co-estimulatórias de osteoclastos e comparar com o controle da infecção bacteriana na doença periodontal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES E COLETA DE AMOSTRAS

As amostras utilizadas neste estudo são provenientes de um banco de amostras derivado de estudos anteriores (FERREIRA et al., 2008; REPEKE et al., 2009; TROMBONE et al., 2009) de nosso grupo de pesquisa, e portanto a seleção dos pacientes e coleta das amostras seguiu protocolo previamente descrito (FERREIRA et al., 2008; REPEKE et al., 2009; TROMBONE et al., 2009). De forma geral as amostras foram coletadas de pacientes provenientes da Faculdade de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). Todos os sujeitos de pesquisa receberam profilaxia supragengival e passaram por um processo de anamnese e mensuração dos índices periodontais: índice de sangramento a sondagem (SS), profundidade de sondagem (PS) e perda de inserção conjuntiva (PIC), além de exames radiográfico complementares. O critério de exclusão compreendeu em pacientes que não concordaram com o consentimento informado e esclarecido, pacientes que apresentavam um histórico de doença sistêmica modificadora das condições periodontais, pacientes submetido a terapia periodontal em um período menor de 2 anos, pacientes fumantes e pacientes que utilizaram quaisquer tipo de medicamentos. Os sujeitos de pesquisa foram divididos em 2 grupos, o grupo (C) Controle (n=48): indivíduos apresentando tecido gengival clinicamente saudável (abaixo de 10% de SS); nenhum sítio com PS>3mm ou apresentando PIC, encaminhados para procedimentos de dentística restauradora; e o grupo (PC) Periodontite Crônica (n=78): indivíduos apresentando moderada ou avançada PS (no mínimo 1 dente por sextante com PS>6mm e PIC>3mm); que receberam terapia periodontal básica, a qual consiste em introdução a higiene oral, profilaxia subgengival, raspagem e alisamento.

3.2 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados camundongos C57Bl/6 (WT), machos, com idade aproximada de 8 semanas, os quais foram obtidos e mantidos junto ao biotério da

Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP. Além de camundongos geneticamente modificados TNFp55-KO, IFN γ -KO, IL17-KO e IL10-KO, machos, com idade aproximada de 8 semanas, os quais foram obtidos junto ao Biotério de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP e mantidos na sequencia dos protocolos experimentais no biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP. No decorrer do protocolo experimental os animais foram alimentados normalmente com ração, sendo que apenas nos dias das inoculações dos microrganismos a alimentação foi suprimida. Os grupos experimentais foram compostos por 8 a 12 camundongo, dependendo da análise realizada e por cada período analisado (5 camundongos para análise de citometria de fluxo, perda óssea alveolar e PCR em tempo real), como previamente descrito (GARLET et al., 2007). O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da FOB/USP (nº: 022/2008) (Anexo A).

3.3 PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE DOENÇA PERIODONTAL

O protocolo de indução da doença periodontal foi realizado como previamente descrito (GARLET et al., 2005; GARLET et al., 2007; GARLET et al., 2008; REPEKE et al., 2010). Resumidamente, *A. actinomycetemcomitans* JP2 foi utilizado nesse estudo, sendo cultivado em jarro de anaerobiose em meio agar suplementado (TSBV). Uma vez colhidos da placa de Petri, os microrganismos foram transferidos para um tubo eppendorf com 100 μ l de PBS, e comparando-se com uma escala padrão de densidade bacteriana em meio líquido, é determinada então a concentração, em CFU da solução. A solução foi diluída de modo a atingir a concentração de 10^9 CFU em 100 μ l de PBS. Os grupos de animais infectados foram submetidos ao protocolo que consiste da inoculação oral de 10^9 CFU em 100 μ l de PBS, acrescida de 2% de carboximetilcelulose, sendo esta solução aplicada diretamente na cavidade oral dos animais com o auxílio de um micropipetador automático. Após 48 horas e 96 horas, o procedimento de inoculação oral é repetido. Grupos controle (animais *sham*-infectados) foram criados a partir da inoculação oral de 100 μ l de uma solução de PBS a 2% de carboximetilcelulose, com metodologia

semelhante a descrita para o grupo anterior. Animais não infectados, com a mesma idade dos demais grupos, foram utilizados como controles negativos.

3.4 COLETA DE AMOSTRAS

As amostras analisadas consistiram no tecido gengival localizados na região de molares superiores, para a citometria de fluxo e quantificação do infiltrado inflamatório; e amostras de tecido gengival localizadas na região dos molares superiores juntamente com o osso alveolar, as quais foram congeladas em nitrogênio líquido, mecanicamente fragmentadas e homogeneizadas em água Milli-Q com Ultra Turrax (IKA, Germany), e submetidas a extração de RNA, para as análises de PCR-RealTime. Para remoção das amostras, foi realizada uma incisão no palato, distal aos molares, perpendicular a linha media. A partir da incisão o tecido palatino foi descolado em toda a sua extensão com um descolador de Molt, até a mesial dos molares, sendo então realizada uma nova incisão de modo a remover o tecido. Em cada tempo, biopsias de cada grupo foram colocadas em Trizol (para as análises de expressão gênica) e congeladas em nitrogênio líquido e conservadas a temperatura de -70°C (para possíveis análises posteriores). Conforme estudos prévios (GARLET et al., 2007; GARLET et al., 2008; REPEKE et al., 2010), as datas para sacrifício dos animais e coleta de amostras foram 0h, 7, 15, 30, 45 e 60 dias após a inoculação inicial de *A. actinomycetemcomitans*.

3.5 AVALIAÇÃO DA REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR

A análise da reabsorção óssea alveolar foi realizada como previamente descrito (GARLET et al., 2007; GARLET et al., 2008; REPEKE et al., 2010). Para a avaliação do nível ósseo periodontal, o protocolo compreende resumidamente: a peça cirúrgica, contendo os processos alveolares, dentes e palato ósseo, foi separada em duas hemi-arcadas pela ruptura da sutura palatina. As peças cirúrgicas foram então tratadas com solução de peróxido de hidrogênio 30 volumes a 50% por 24 horas para a remoção dos tecidos moles. O material foi então fotografado em

lupa de dissecação, com aumento de 20 vezes (Zeiss), com a face oclusal dos molares posicionada perpendicularmente a base da lupa, e de modo a ser fotografada a face palatina. As imagens foram codificadas, de modo a que quando realizada a medição o examinador não saiba a que grupo ou tempo a amostra fazia parte. Com o auxílio do programa de análise de imagens ImageToll 2.0 (The University of Texas Health Science Center, San Antonio, USA), foi realizada então a medição da área compreendida entre a junção amelocementária e a crista óssea alveolar, em unidades arbitrárias de área (UAA), correspondentes aos pixels contidos na área selecionada. As medições foram realizadas por um único examinador calibrado, em duplicata, com intervalo de 1 semana entre as medições. Para cada animal, a perda óssea alveolar foi definida como a média da área total entre a junção amelocementária e a crista óssea alveolar, avaliada na face palatina dos 6 dentes posteriores. Para as análises da reabsorção óssea alveolar, foram analisadas maxilas proveniente de 5 camundongos de cada grupo experimental, coletadas nos tempos de 0h, 7, 15, 30, 45 e 60 dias após a infecção, de três experimentos independentes.

3.6 ANÁLISE QUANTITATIVA DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO

A análise quantitativa e fenotípica de células extraídas dos tecidos periodontais foi realizada por citometria de fluxo, como previamente descrito (GARLET et al., 2007; GARLET et al., 2008; REPEKE et al., 2010). O isolamento e caracterização dos leucócitos presentes na região de lesão periodontal foram realizadas como descrito previamente. As amostras analisadas consistiram do tecido gengival localizados na região de molares superiores, as quais foram separadas e depositados em placas de 12 poços (Corning) contendo 1 ml de meio incompleto (RPMI) e liberase (1:100) e então incubadas a 37°C durante 1 hora. Após a incubação, foram colocados em trituradores (medcons) juntamente com meio completo a 10% e DNase 0,05% (Sigma DN-25) e triturados no Medmachine por 4 min. O líquido foi aspirado com uma seringa de 10ml, filtrado (Filcons) em tubo Falcon de 15ml e adicionados aproximadamente 10ml de meio completo e DNase. A suspensão celular foi centrifugada 500 x g. O pellet foi ressuspenso em 1ml de meio

completo a 10% e células foram contadas em câmara de Newbauer, sendo que o número absoluto de leucócitos utilizado para a análise quantitativa das células inflamatórias. Para as análises quantitativa das células inflamatórias nos tecidos periodontais foi utilizado um “pool” contendo o tecido gengival palatino de 5 animais de cada grupo experimental, coletados nos tempos de 0h, 7, 15, 30 e 60 dias após a infecção; foram considerados dados provenientes de três experimentos independentes.

3.7 EXTRAÇÃO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA

A extração do RNA total foi realizada com o reagente Trizol, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante (Invitrogen, Rockville, MD, USA), nos tecidos periodontais como previamente descrito (GARLET et al., 2007; GARLET et al., 2008; REPEKE et al., 2010). Os procedimentos foram realizados a partir de amostras de tecido gengival localizadas na região dos molares superiores juntamente com o osso alveolar, as quais foram congeladas em nitrogênio líquido, mecanicamente fragmentadas e homogeneizadas em água Milli-Q com Ultra Turrax (IKA, Germany), e submetidas a extração de RNA. A extração do RNA total foi realizada com o reagente Trizol, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante (Invitrogen, Rockville, MD, USA) como previamente descrito (GARLET et al., 2007; GARLET et al., 2008; REPEKE et al., 2010). Brevemente, para cada amostra, em um tubo tipo “eppendorf”, foi adicionado o reagente Trizol (1 ml para 1 mg de tecido), sendo agitado por 30 segundos e deixadas à temperatura ambiente por 5 minutos. Para cada 1 ml da suspensão foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio (Sigma) e centrifugadas a 13000 RPM por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, ao qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol, sofrendo agitação em “vortex” e incubado por no 20 minutos a -20°C para precipitar o RNA da fase aquosa. Novamente os tubos foram centrifugados a 13000 RPM por 15 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado em etanol 100%, sendo então seco a temperatura ambiente, com o tubo invertido sobre um papel de filtro. As amostras de RNA foram suspensas em 50µl de água deionizada e livre de Rnase, sendo então as amostras armazenadas a -70°C. Uma alíquota de 5µl foi

utilizada para a obtenção concentração de RNA/ μ l nas amostras, determinada usando o aparelho GeneQuant (Pharmacia, USA). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado através de uma reação de transcrição reversa, com a utilização de uma transcriptase reversa (Superscript II, Gibco Life Tech.) utilizando 5 μ g de RNA, de acordo com as especificações do fabricante. Reações em cadeia da polimerase (PCRs) foram realizadas utilizando a enzima *Taq* polimerase (GIBCO Life Tech.) no termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA). As condições básicas da reação são 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 54°C e 2 minutos 72°C, acrescidos de um passo de extensão final de 7 minutos a 72°C. Todas as amostras também foram submetidas a reações para a detecção de RNA mensageiro para a beta-actina, um gene de expressão constitutiva, utilizado como controle positivo da reação de amplificação. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das sequências dos primers utilizados. Os produtos de PCR foram submetidos eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e corados com nitrato de prata 0.2%.

3.8 REAÇÕES DE REAL TIME PCR

Uma vez confirmada a positividade da detecção de beta-actina por RT-PCR, bem como a integridade das amostras, a expressão quantitativa de genes de citocinas no tecido periodontal, foi analisada através de reações de RealTimePCR, utilizando-se o sistema SYBRGreen em um aparelho GeneAmp 7000 (Applied Biosystems – USA) (GARLET et al., 2007; GARLET et al., 2008; REPEKE et al., 2010). Primers adequados para tais reações foram criados a partir do programa Primer Express (Apêndice A), e tais reações já estavam devidamente padronizadas e utilizadas na rotina do laboratório. Esse sistema realiza as reações de amplificação e detecção e quantifica as amostras (ABI Prism Software) através de nucleases fluorogênicas utilizadas na reação, sendo tal expressão normalizada com base em controles endógenos. O DNA complementar sintetizado a partir do RNA mensageiro foi utilizado juntamente com reagentes SYBR Green, como determinado pelo fabricante. A reação compreende 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, além de um ciclo final de vinte

minutos, com temperatura crescente de 60 a 95°C foi empregada para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor de CT (cycle threshold – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos aonde a amplificação atinge um dado limiar, que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Para as reações de RealTimePCR, foram utilizadas independentemente amostras de cDNA proveniente do RNA extraído do tecido periodontal de 5 animais de cada grupo experimental, coletados nos tempos de 0h, 7, 15, 30, 45 e 60 dias após a infecção; foram analisados os dados de três experimentos independentes.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análises entre três ou mais grupos experimentais, como os dados relativos ao número de células inflamatórias, níveis de reabsorção óssea, níveis de expressão de mRNA, dos animais infectados, animais sham infectados ou não infectados, foram submetidos ao teste estatístico one-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. Nas análises entre apenas dois grupos ou amostras foi utilizado o teste “t”. As possíveis correlações, dos próximos experimentos, serão analisadas através de regressão linear, ou do teste de Pearson. Para todas as análises, valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todos os testes estatísticos, adequados aos experimentos, grupos e valores obtidos foram aplicados através dos programas GraphPad InStat e Prism5 (GraphPad, San Diego, CA).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS DE OSTEOCLASTOS EM HUMANOS COM DOENÇA PERIODONTAL

Antes de qualquer análise experimental em relação às moléculas co-estimulatórias e a doença periodontal em camundongos, faz-se necessário a certeza de que estas estariam presentes na doença periodontal humana. Dada a devida importância, nosso primeiro passo foi analisar a expressão das moléculas co-estimulatórias na doença periodontal crônica em seres humanos (Fig. 2).

Figura 2 - Cinética de expressão de moléculas co-estimulatórias nos tecidos periodontais de humanos com doença periodontal crônica. Amostras de tecido periodontal de humanos portadores de doença periodontal crônica (PC) e controle (C) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de DAP-12, TREM-2 e SIRPβ1 e FcRγ, OSCAR e PIR-A foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina. Um experimento representativo de três experimentos independentes. * $p < 0.05$ vs C.

Os resultados demonstraram que, todas as moléculas co-estimulatórias de osteoclasto (DAP-12, TREM-2 e SIRPβ1 e FcRγ, OSCAR e PIR-A) apresentaram-se com expressão significativamente aumentada ($p < 0,05$ vs C) em pacientes com doença periodontal crônica (PC) quando comparadas aos sujeitos controle desta pesquisa (C).

4.2 CINÉTICA DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E DE REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS WT INFECTADOS POR *A.a.*

Considerando que a migração de células inflamatórias pode apresentar um impacto direto no processo de perda óssea associada às DP, assim como propiciar a migração para os tecidos periodontais de precursores de osteoclastos expressando os complexos de moléculas co-estimulatórias de osteoclastos, nosso primeiro passo experimental foi caracterizar a cinética de desenvolvimento da resposta inflamatória e o aumento de perda óssea alveolar em resposta à inoculação de *A.a.* (Fig. 3).

Figura 3 - Migração de células inflamatórias e perda óssea alveolar induzida por *A. actinomycetemcomitans* em camundongos. Camundongos C57BL/6 (WT) submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A. actinomycetemcomitans* (AA), grupos de animais foram analisados quanto à cinética de desenvolvimento de reação inflamatória nos tecidos periodontais e perda óssea alveolar. A) Número de leucócitos extraídos através de digestão enzimática do tecido periodontal, corados com azul de tripam e contados em câmara de Neubauer. B) Aumento da área JAC-COA (Junção Amelo Cementária – Crista Óssea Alveolar) na face palatina dos molares, em relação aos animais controle, medida em unidades arbitrárias de área (UAA) com o programa ImageToll 2.0. Os resultados representam os valores da média $\pm$ SD, da área JAC-COA ou número de células por animal.

Nossos resultados demonstraram que os animais infectados (WT-AA) apresentaram uma tendência a um aumento no número de células inflamatórias ao tempo de 7 dias pós-infecção (PI; $p > 0,05$ vs 0h) e um aumento significativo nos demais tempos analisados, 15, 30, 45 e 60 dias PI ($p < 0,05$ vs 0h), chegando ao pico no período de 30 dias e sofrendo uma redução na quantidade de células inflamatórias nos tempos posteriores de 45 e 60 dias ($p > 0,05$ vs 30d). Quando

comparados aos animais WT não infectados com os camundongos do grupo infectado (WT-AA), observamos que em todos os tempos analisados, exceto o de 0 hora, o número de célula inflamatória apresentou-se significativamente maior nos camundongos WT-AA ($p < 0,05$).

Em relação à reabsorção óssea, observamos um aumento gradual determinado pelo crescente aumento na área compreendida entre a junção amelo-cementária (JAC) e a crista óssea alveolar (COA) nos camundongos submetidos à doença periodontal experimental (WT-AA), apresentando uma tendência à reabsorção ao tempo de 15 dias ($p > 0,05$ vs 0h) e um aumento significativo nos tempos de 30, 45 e 60 dias PI ($p < 0,05$ vs 0h). Quando comparados os animais infectados (WT-AA) com os não infectados (WT), encontramos diferenças significativas em todos os tempos posteriores (30, 45 e 60 dias PI; $p < 0,05$) e uma tendência no tempo de 15 dias PI ($p > 0,05$).

4.3 ANÁLISE FENOTÍPICA DAS CÉLULAS INFLAMATÓRIAS EXTRAÍDAS DOS TECIDOS PERIODONTAIS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *A.a*.

Tendo observado que aos 30 dias do desenvolvimento da doença periodontal obtivemos a maior quantidade de células inflamatórias nos camundongos infectados (WT-AA), e que tal tempo se mostrava também como um dos tempos experimentais nos quais se verificava uma nítida progressão da perda óssea, nosso próximo passo foi fenotipar tais células, ao tempo de 30 dias, visando caracterizar a positividade diferentes tipos celulares para as moléculas co-estimulatórias de osteoclastos (Fig. 4).

Figura 4 - Análise fenotípica dos leucócitos extraídos dos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal palatino de camundongos C57BL/6 WT submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A. actinomycetemcomitans* foram coletadas, ao tempo de 30 dias, submetidas à digestão enzimática, e a contagem de células realizada em câmara de Neubauer. Para as análises de citometria de fluxo, 1×10^6 cel/ml células foram incubadas com anticorpos conjugados a fluorocromos específicos para os seguintes marcadores: TREM-2, SIRPβ1, DAP-12, FcRγ, OSCAR, PIR-A, CD115 e RANK e a análise realizada em FACScan utilizando-se parâmetros de tamanho (FSC), granularidade (SSC), e fluorescência (FL1 e FL2). A porcentagem de células CCR2+, CCR5+ e CCR4+ que coexpressavam os marcadores TREM-2, SIRPβ1, DAP-12, FcRγ, OSCAR, PIR-A, CD115 e RANK, foram calculados proporcionalmente em relação ao número de células CCR2+, CCR5+ ou CCR4+ totais.

Ao fenotiparmos as células inflamatórias, observamos que quase 50% delas apresentavam positividade para as moléculas acessórias DAP-12 e FcR γ . Além do mais, aproximadamente 25% apresentaram positividade para os receptores CD115 (receptor de M-CSF) e RANK, seguidos pelas outras moléculas co-estimulatórias OSCAR, PIR-A, TREM-2 e SIRP β 1 (Fig. 4a).

De acordo com resultados anteriores do nosso grupo (SILVA et al., 2005; CLAUDINO et al., 2008), foi demonstrado que, uma grande parcela das células inflamatórias CCR2+ presentes no tecido gengival de camundongos com DP experimental caracterizavam-se por macrófagos/monócitos. Desta forma analisamos a positividade das células CCR2+ para as moléculas co-estimulatórias, assim observamos que aproximadamente 75% das células CCR2+ também apresentam positividade para FcR γ e CD115; aproximadamente 60% foram positivas para RANK, OSCAR e DAP-12; e mais de 40% positivas para TREM-2, PIR-A e SIRP β 1 (Fig. 4b).

Resultados publicados pelo nosso grupo de pesquisa, demonstram que aos 30 dias de DP experimental, células CCR5+ são compostas por uma importante parcela das células correspondentes a células Th1 e macrófagos (O'GARRA; McEVOY; ZLOTNIK, 1998). Assim, também analisamos a positividade das células CCR5+ para as moléculas co-estimulatórias. Os resultados demonstraram que aproximadamente 50% das células CCR5+ também são positivas para FcR γ e DAP-12, e que de 30 a 20% das células são positivas para TREM-2, OSCAR, CD115, SIRP β 1, PIR-A e RANK.

Também analisamos a positividade de células que não apresentam papéis diretos com formação do osteoclasto, como linfócitos Th2 e Tregs, os quais apresentam a maioria das células CCR4+ na DP em camundongos no período de 30 dias (HIDA et al., 2009). Observamos uma baixa dupla positividade entre o receptor CCR4 e as moléculas referentes a osteoclastogênese analisadas, com exceção de FcR γ , que apresentou-se em um pouco menos de 50% das células CCR4+.

4.4 CINÉTICA DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS CCR2+, CCR5+ E CCR4+ PARA OS TECIDOS PERIODONTAIS DE CAMUNDONGOS WT INFECTADOS COM *A.a.*

Figura 5 - Análise cinética das células CCR2+, CCR5+, e CCR4+ extraídas dos tecidos periodontais de camundongos C57BL/6 WT infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Células extraídas nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias após infecção com *A. actinomycetemcomitans* e analisadas através de citometria de fluxo. Os resultados representam os valores da média $\pm$ SD. * $p < 0,05$; teste t, total vs CCR+ no mesmo tempo experimental.

Ao observarmos quais células são positivas para as moléculas co-estimulatórias, nossa próxima análise foi demonstrar a cinética das células CCR2+, CCR5+ e CCR4+ no desenvolvimento da DP em camundongos. Os resultados demonstram que as células CCR2+ e CCR5+ aumentam a quantidade logo nos primeiros 7 dias, chegando em sua quantidade máxima no período de 15 dias, decaindo ao decorrer do desenvolvimento da DP experimental. Diferentemente, as células CCR4+, apresentam um aumento progressivo no decorrer da DP, apresentando maiores números nos períodos posteriores, chegando na quantidade máxima no período de 60 dias.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES OSTEOCLASTOGÊNICOS NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR *A.a.*

Uma vez que observamos que os camundongos que foram inoculados por *A.a.* apresentaram uma crescente reabsorção óssea, um dos eventos principais na patogênese das DPs, nosso próximo objetivo foi caracterizar a expressão de marcadores osteoclastogênicos nos tecidos periodontais dos camundongos WT-AA (Fig. 6).

Figura 6 - Cinética de expressão de RANKL, Catepsina K e OPG nos tecidos periodontais de camundongos WT-AA infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos C57BL/6 (WT) submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A. actinomycetemcomitans* foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de RANKL, Catepsina K e OPG foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 3 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os tempos do mesmo grupo experimental ($p < 0,05$).

Em relação à expressão de RANKL e Catepsina K, observou-se um intenso aumento no tempo de 7 dias pós-infecção ($p < 0,05$ vs 0h), mantendo-se alta no período de 15 dias ($p < 0,05$ vs 0h) e sofrendo uma redução na expressão nos períodos posteriores de 30 e 60 dias ($p < 0,05$ vs 0h) nos camundongos infectados (WT-AA). Diferentemente a expressão de OPG apresentou um aumento gradual chegando ao pico nos períodos mais tardios de 30 e 60 dias pós-infecção nos camundongos WT-AA ($p < 0,05$ vs 0h).

4.6 ANÁLISE DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS DE OSTEOCLASTOS NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR A.a.

Observando que, os camundongos do grupo de DP experimental apresentaram exacerbada perda óssea e alta expressão de fatores osteoclastogênicos, como é o caso de RANKL, e tendo em vista a necessidade de co-estímulo para osteoclastogênese, analisamos a expressão de moléculas co-estimulatórias de osteoclastos (DAP-12, TREM-2 e SIRP β 1, e FcR γ , OSCAR e PIR-A) nos tecidos gengivais de camundongos (Fig. 7 e 8).

Figura 7 - Expressão de moléculas co-estimulatórias nos tecidos periodontais de camundongos C57BL/6 infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos C57BL/6 (WT) submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A. actinomycetemcomitans* foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de DAP-12, TREM-2 e SIRPβ1 foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 5 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. * $p < 0.05$ vs WT.

A primeira molécula co-estimulatória analisada foi a molécula adaptadora DAP-12 (Fig. 7a). Os resultados encontrados nos camundongos WT-AA, demonstraram um intenso aumento na expressão de DAP-12 no dia 7 pós-infecção ($p < 0,05$ vs 0h). Interessantemente, observou-se uma significativa redução no tempo de 15 dias pós-infecção quando comparado ao dia 7 ($p < 0,05$ vs 7d), apresentando um significativo aumento nos demais tempos posteriores de 30 e 60 dias pós-infecção ($p < 0,05$ vs 15d). Todos os tempos analisados (7, 15, 30, 60 dias) apresentaram uma expressão de DAP-12 significativamente maior quando comparado ao tempo de 0h ($p < 0,05$) e quando comparados aos camundongos WT não infectados ($p < 0,05$).

Sabendo que a expressão de DAP-12 apresentou-se aumentada nos camundongos infectados, e que esta molécula adaptadora faz parte de um complexo de moléculas co-estimulatórias de osteoclastos junto com outras duas moléculas co-estimulatórias TREM-2 (triggering receptor expressed in myeloid cells) e SIRP β 1 (proteína de sinal regulatório β 1), a próxima molécula co-estimulatória de osteoclastos analisada foi TREM-2 (Fig. 7b). De forma similar à expressão de DAP-12, a expressão de TREM-2 apresentou um aumento significativo no dia 7 pós-infecção ($p < 0,05$ vs 0h), mantendo-se estável no período de 15 dias e voltando a aumentar nos períodos finais de 30 e 60 dias ($p < 0,05$ vs 7d). Assim como DAP-12, os camundongos WT-AA apresentaram uma expressão de TREM-2 significativamente mais alta quando comparados aos camundongos WT não infectados em todos os tempos analisados (7, 15, 30 e 60d; $p < 0,05$), com exceção do tempo de 0 horas ($p > 0,05$).

Seguindo um padrão obtido na cinética de expressão de TREM-2, os camundongos WT-AA demonstraram um aumento significativo na expressão da molécula co-estimulatória de osteoclasto SIRP β 1 no período de 7 dias pós-infecção (Fig. 7c; $p < 0,05$ vs 0h). Este aumento manteve-se crescentes nos demais períodos posteriores ($p < 0,05$; 15, 30 e 60 d vs 0h). Interessantemente, observamos uma cinética de expressão de SIRP β 1 semelhante à obtida na expressão de TREM-2, onde em todos os períodos pós 0 horas, os camundongos WT-AA apresentaram expressões aumentadas se comparados ao WT ($p < 0,05$).

Tendo em vista a expressão aumentada das moléculas co-estimulatórias de osteoclasto do complexo de receptores DAP-12, TREM-2 e SIRP β 1 nos camundongos infectados por A.a. e sabendo da existência de um complexo homólogo a este, nosso objetivo seguinte foi analisar a cinética de expressão das

moléculas co-estimulatórias de osteoclastos do complexo de receptores FcR γ , OSCAR e PIR-A nos tecidos periodontais de camundongos WT (Fig. 8).

Figura 8 - Cinética de expressão de moléculas co-estimulatórias nos tecidos periodontais de camundongos C57BL/6 infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos C57BL/6 (WT) submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A. actinomycetemcomitans* foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de FcR γ , OSCAR e PIR-A foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 5 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. * $p < 0.05$ vs WT.

Em relação à cinética de expressão de FCR γ (Fig. 8a), observou-se um intenso aumento no tempo de 7 dias pós inoculação de *A.a.* ($p < 0,05$ vs 0h) permanecendo estável nos demais tempos analisados, 15, 30 e 60 dias pós inoculação ($p < 0,05$ vs 0h). Concordando com as expressões de moléculas co-estimulatórias de osteoclastos do complexo de receptores DAP-12, TREM-2 e SIRP β 1, foi observado no grupo de camundongos infectados WT-AA uma expressão de FCR γ significativamente maior quando comparado ao grupo de camundongos não infectados WT em todos os tempos analisados ($p < 0,05$), exceto o tempo de 0 horas ($p > 0,05$).

A expressão de PIR-A em camundongos WT-AA seguiu um padrão muito semelhante à cinética de expressão de FCR γ , apresentando um intenso aumento no tempo de 7 dias pós inoculação ($p < 0,05$ vs 0h) e mantendo-se estável nos demais tempos posteriores ($p < 0,05$ vs 0h). Similar às demais moléculas co-estimulatórias analisadas, a expressão de PIR-A apresentou-se significativamente maior nos tempos de 7, 15, 30 e 60 dias pós-infecção nos camundongos infectados WT-AA quando comparados com os WT não infectados (Fig. 8c; $p < 0,05$).

Finalmente, concluindo a análise da última molécula co-estimulatória de osteoclastos do complexo FCR γ , PIR-A e OSCAR, nosso objetivo seguinte foi à caracterização da cinética de expressão da molécula co-estimulatória de osteoclasto OSCAR nos tecidos periodontais de camundongos WT (Fig. 8b).

Camundongos WT infectados por *A.a.* apresentaram um aumento significativo na expressão de OSCAR no sétimo dia pós-infecção ($p < 0,05$ vs 0h) mantendo-se estável no tempo de 15 dias pós-infecção ($p < 0,05$ vs 0h). Ao período de 30 dias pós-infecção, a expressão de PIR-A obteve um intenso aumento ($p < 0,05$ vs 15d), chegando ao pico no tempo de 60 dias pós-infecção ($p < 0,05$ vs 0h, 7d, 15d).

4.7 ANÁLISE DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS PRÓ- E ANTI-INFLAMATÓRIAS NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR *A.a.*

Citocinas de diferentes classes (pró- e anti-inflamatórias) exercem um papel fundamental no desenvolvimento da perda óssea inflamatória através da modulação direta dos fatores envolvidos na osteoclastogênese, o que potencialmente inclui as moléculas co-estimulatórias de osteoclastos. Com isso, analisamos a expressão de citocinas pró- (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-17) e anti- (IL-10) inflamatórias nos camundongos WT infectados por *A.a.* (Fig. 9).

Figura 9 - Cinética de expressão de citocinas nos tecidos periodontais de camundongos C57BL/6 infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos C57BL/6 (WT) submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A. actinomycetemcomitans* foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-1 β , e IL-10 foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 3 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os tempos do mesmo grupo experimental ($p < 0,05$).

Observou-se nos resultados um intenso aumento na expressão das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-1 β , nos camundongos infectados, ao tempo de 7 dias pós-infecção ($p < 0,05$ vs 0h), início do desenvolvimento da DP experimental, mantendo-se intenso no tempo de 15 dias pós-infecção ($p < 0,05$ vs 0h) e apresentando uma redução na expressão nos tempos posteriores (30 e 60 dias; $p < 0,05$ vs 0h). Diferentemente, a expressão de IL-17 apresentou um aumento gradual em relação ao desenvolvimento da DP experimental, onde observamos uma tendência a aumento aos 7 dias pós-infecção ($p > 0,05$ vs 0h) e um aumento gradual significativo nos demais tempos analisados (7, 15, 30 e 60d; $p < 0,05$ vs 0h).

Por sua vez, a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 apresentou-se aumentada somente nos dias posteriores na patogênese da doença periodontal nos camundongos infectados, onde se observa um intenso aumento na expressão nos dias de 30 e 60 pós-infecção ($p < 0,05$ vs 0h).

4.8 PAPEL DA CITOCINA TNF- α NA CINÉTICA DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E DE REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *A.a.*

Visto que em nosso modelo experimental de doença periodontal as moléculas co-estimulatórias de osteoclastos apresentaram-se aumentadas e que a expressão de citocinas clássicas acompanharam este aumento no desenvolvimento da doença, passamos a analisar a influencia de tais citocinas na expressão das moléculas co-estimulatórias de osteoclasto. Desta forma, utilizamos camundongos geneticamente modificadas para não produzir as citocinas supra descritas.

Primeiramente foi caracterizada a cinética de migração de células inflamatórias e de reabsorção óssea alveolar de camundongos TNFp55-KO e compará-las com a cinética dos camundongos WT (Fig. 10).

Figura 10 - Reação inflamatória e perda óssea alveolar induzida por *A. actinomycetemcomitans* em animais TNFp55-KO. Camundongos TNFp55-KO e C57Bl/6 (WT) submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.a.*, grupos controle de animais não infectados e sham-infectados, foram analisados quanto a cinética de desenvolvimento de reação inflamatória nos tecidos periodontais e perda óssea alveolar. A) Número de células inflamatórias extraídas através de digestão enzimática do tecido periodontal, corados com azul de tripam e contados em câmara de Neubauer. B) Aumento da distância JAC-COA na face palatina dos molares, em relação aos animais controle, mediada em unidades arbitrárias de área (UAA) com o programa ImageTool 2.0. * $p < 0,05$ vs WT-AA

Nossos resultados demonstraram uma significativa redução no número absoluto de células inflamatórias extraídas do tecido gengival dos animais TNFp55-KO aos 7, 15 e 30 dias ($p < 0,05$ vs WT-AA) após a infecção, quando comparados aos animais WT infectados com *A.a.* (Fig. 10a). Da mesma forma que na migração de células inflamatórias, na reabsorção óssea alveolar, constatamos que os animais TNFp55-KO apresentaram uma significativa redução na área entre a junção amelo-cementária (JAC) e a crista óssea alveolar (COA) aos 15 e 30 dias ($p < 0,05$ vs WT) quando comparados aos camundongos WT-AA.

4.9 INFLUENCIA DA CITOCINA TNF- α NA MODULAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS DE OSTEOCLASTOS NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR *A.a*.

Sabendo do papel da citocina TNF- α na severidade da doença periodontal experimental, nosso próximo passo foi analisar a influencia desta citocina na expressão de moléculas co-estimulatórias de osteoclasto nos tecidos gengivais de camundongos com doença periodontal (Fig. 11).

Figura 11 - Cinética de expressão de moléculas co-estimulatórias nos tecidos periodontais de camundongos TNFp55-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos TNFp55-KO submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A. actinomycetemcomitans* foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de DAP-12, TREM-2 e SIRP β 1 e FcR γ , OSCAR e PIR-A foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 5 animais nos tempo 7 e 30; e 2 animais no tempo de 0h. Um experimento representativo de três experimentos independentes; * $p < 0.05$ vs WT-AA.

A primeira molécula co-estimulatória analisada foi a molécula adaptadora DAP-12 (Fig. 11a). Os resultados encontrados nos camundongos TNFp55-KO demonstraram um aumento significativo na expressão de DAP-12 aos 7 dias pós-infecção ($p < 0,05$ vs 0h) mantendo-se constante aos 30 dias ($p > 0,05$ vs 0h; $p > 0,05$ vs 7 dias). Quando comparados aos camundongos WT-AA, observamos que os camundongos TNFp55-KO apresentaram uma expressão significativamente menor nos tempos de 7 e 30 dias ($p < 0,05$ vs WT-AA). De forma semelhante a DAP-12, suas moléculas associadas TREM-2 (Fig. 11b) e SIRP β 1 (Fig. 10c) apresentaram um aumento significativo no tempo de 7 dias pós-infecção ($p < 0,05$ vs 0h) nos camundongos TNFp55-KO infectados, mantendo-se constantes no tempo de 30 dias para a molécula SIRP β 1 ($p > 0,05$ vs 7 dias) e aumentando ainda mais no tempo de 30 dias na expressão de TREM-2 ($p < 0,05$ vs 7 dias). Ao compararmos a expressão de TREM-2 e SIRP β 1 entre as linhagens de camundongos, observamos que em ambos os tempos, 7 e 30 dias, os camundongos TNFp55-KO apresentaram uma expressão significativamente diminuída em relação aos camundongos WT-AA ($p < 0,05$).

Ao analisarmos o outro complexo de moléculas co-estimulatórias de osteoclasto (FcR γ , OSCAR e PIR-A), observamos que a molécula adaptadora FcR γ e a molécula a ela associada PIR-A apresentaram um aumento significativo aos 7 dias ($p < 0,05$ vs 0h) nos camundongos TNFp55-KO com DP experimental, aumentando ainda mais no tempo de 30 dias ($p < 0,05$ vs 7 dias). Diferentemente de OSCAR, onde apenas observamos um aumento significativo no tempo de 30 dias ($p > 0,05$ vs 0h; $p < 0,05$ vs 7 dias) em camundongos TNFp55-KO. Ao compararmos os camundongos TNFp55-KO com os WT, ambas as linhagens infectadas, observamos que em todas as moléculas co-estimulatórias de osteoclasto e em todos os tempos analisados, as expressões nos camundongos TNFp55-KO apresentavam-se significativamente diminuídas ($p < 0,05$) quando comparadas com os WT-AA; com uma única exceção na molécula OSCAR ao tempo de 7 dias, onde observa-se um tênue, porém significativo, aumento na expressão nos camundongos WT-AA comparados aos TNFp55-KO infectados ($p < 0,05$).

4.10 PAPEL DA CITOCINA IFN- γ NA CINÉTICA DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E DE REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *A.a.*

Após a análise do papel da citocina TNF- α na DP experimental e nas moléculas co-estimulatórias de osteoclastos, nosso próximo passo foi verificar a influencia da citocina IFN- γ na modulação da reação inflamatória e da reabsorção óssea (Fig. 12).

Figura 12 - Reação inflamatória e perda óssea alveolar induzida por *A. actinomycetemcomitans* em animais IFN γ -KO. Camundongos IFN γ -KO e C57Bl/6 (WT) submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.a.*, grupos controle de animais não infectados e sham-infectados, foram analisados quanto à cinética de desenvolvimento de reação inflamatória nos tecidos periodontais e perda óssea alveolar. A) Número de células inflamatórias extraídas através de digestão enzimática do tecido periodontal, corados com azul de tripam e contados em câmara de Neubauer. B) Aumento da distância JAC-COA na face palatina dos molares, em relação aos animais controle, mediada em unidades arbitrárias de área (UAA) com o programa ImageTool 2.0. *p<0,05 vs WT-AA.

Desta forma, observamos uma significativa redução no número de células inflamatórias presentes nos tecidos periodontais dos animais IFN γ -KO aos 7, 15 e 30 dias ($p < 0,05$) pós-infecção, quando comparados aos animais WT-AA (Fig. 12a). Com relação a reabsorção óssea, constatamos um menor aumento na área entre a junção amelo-cementária (JAC) e a crista óssea alveolar (COA) nos animais IFN γ -KO aos 30 e 45 dias pós-infecção ($p < 0,05$), quando comparados aos animais WT-AA (Fig. 12b).

4.11 INFLUENCIA DA CITOCINA IFN- γ NA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS DE OSTEOCLASTOS NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR *A.a*.

Figura 13 - Cinética de expressão de moléculas co-estimulatórias nos tecidos periodontais de camundongos IFN γ -KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos IFN γ -KO submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A. actinomycetemcomitans* foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de DAP-12, TREM-2 e SIRP β 1 e FcR γ , OSCAR e PIR-A foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 5 animais nos tempo 7 e 30; e 2 animais no tempo de 0h. Um experimento representativo de três experimentos independentes; * $p < 0.05$ vs WT-AA.

Nossos resultados na cinética de expressão das moléculas co-estimulatórias de osteoclastos, nos camundongos IFN γ -KO infectados (Fig. 13), demonstraram que todas as moléculas co-estimulatórias aumentaram significativamente ao período de 7 dias pós-infecção ($p < 0,05$ vs 0h), continuando a aumentar no tempo de 30 dias nas moléculas TREM-2, OSCAR e PIR-A ($p < 0,05$ vs 7 dias); e mantendo-se constante nas demais moléculas, DAP-12, FcR γ e SIRP β 1 ($p > 0,05$ vs 7 dias). Ao compararmos as expressões das moléculas co-estimulatórias de osteoclasto nas duas linhagens de camundongos, observamos que com exceção do tempo de 7 dias de SIRP β 1 ($p > 0,05$), todas as moléculas em todos os tempos apresentaram uma expressão significativamente maior nos camundongos WT-AA quando comparados aos camundongos IFN γ -KO ($p < 0,05$).

4.12 PAPEL DA CITOCINA IL-17 NA MODULAÇÃO DA CINÉTICA DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E DE REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *A.a.*

Figura 14 - Reação inflamatória e perda óssea alveolar induzida por *A. actinomycetemcomitans* em animais IL17-KO. Camundongos IL17-KO e C57Bl/6 (WT) submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.a.*, grupos controle de animais não infectados e sham-infectados, foram analisados quanto à cinética de desenvolvimento de reação inflamatória nos tecidos periodontais e perda óssea alveolar. A) Número de células inflamatórias extraídas através de digestão enzimática do tecido periodontal, corados com azul de tripam e contados em câmara de Neubauer. B) Aumento da distância JAC-COA na face palatina dos molares, em relação aos animais controle, mediada em unidades arbitrárias de área (UAA) com o programa ImageTool 2.0. * $p < 0,05$ vs WT-AA.

Nossos resultados nos camundongos IL17-KO, demonstraram que apesar de não haver nenhuma diferença estatística entre os camundongos infectados WT (WT-AA) e IL17-KO, em nenhum período analisado, levando em consideração a quantidade de células inflamatórias ou reabsorção óssea alveolar, observamos uma forte tendência a diminuição, tanto na cinética de células inflamatórias quanto na reabsorção óssea alveolar dos camundongos deficientes de IL-17, principalmente após o período de 15 dias PI ($p > 0,05$).

4.13 INFLUENCIA DA CITOCINA IL-17 NA MODULAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS DE OSTEOCLASTOS NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR *A.a.*

Figura 15 - Cinética de expressão de moléculas co-estimulatórias nos tecidos periodontais de camundongos IL17-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos IL17-KO submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A. actinomycetemcomitans* foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de DAP-12, TREM-2 e SIRPβ1 e FcRγ, OSCAR e PIR-A foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média ± SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 5 animais nos tempo 7 e 30; e 2 animais no tempo de 0h. Um experimento representativo de três experimentos independentes; *p<0.05 vs WT-AA.

Ao analisarmos a cinética de expressão das moléculas co-estimulatórias de osteoclasto nos camundongos IL17-KO (Fig. 15), observamos que todas as moléculas (DAP-12, TREM-2, SIRP β 1 e FcR γ , OSCAR e PIR-A) apresentaram um aumento significativos ao tempo de 7 dias pós-infecção PI ($p < 0,05$ vs 0h), aumentando significativamente ainda mais ao tempo de 30 dias PI ($p < 0,05$ vs 7 dias).

Quando comparada as expressões das moléculas co-estimulatórias de osteoclasto entre as linhagens de camundongos, observamos que os camundongos IL17-KO apresentam em todas as moléculas e em todos os tempos analisados uma significativa redução ($p < 0,05$); com exceção do tempo de 7 dias pós-infecção da molécula SIRP β 1, onde não obtivemos diferenças significativas entre as linhagens ($p > 0,05$).

4.14 PAPEL DA CITOCINA ANTI-INFLAMATÓRIA IL-10 NA CINÉTICA DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E DE REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *A.a.*

Tendo em vista a participação das citocinas de carácter inflamatório na modulação da doença periodontal experimental e na expressão de moléculas co-estimulatórias de osteoclasto no tecido gengival de camundongos infectados por *A.a.*, nosso próximo passo foi analisar o papel da citocina anti-inflamatória IL-10 na modulação da intensidade da resposta inflamatória e na reabsorção óssea alveolar (Fig. 16).

Figura 16 - Reação inflamatória e perda óssea alveolar induzida por *A. actinomycetemcomitans* em animais IL10-KO. Camundongos IL10-KO e C57Bl/6 (WT) submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.a.*, grupos controle de animais não infectados e sham-infectados, foram analisados quanto à cinética de desenvolvimento de reação inflamatória nos tecidos periodontais e perda óssea alveolar. A) Número de células inflamatórias extraídas através de digestão enzimática do tecido periodontal, corados com azul de tripam e contados em câmara de Neubauer. B) Aumento da distância JAC-COA na face palatina dos molares, em relação aos animais controle, mediada em unidades arbitrárias de área (UAA) com o programa ImageTool 2.0. * $p < 0,05$ vs WT-AA.

A análise quantitativa de células inflamatórias extraídas do tecido gengival dos animais IL10-KO demonstrou um aumento significativo nos leucócitos extraídos aos tempos de 15 e 30 dias PI ($p < 0,05$) quando comparados aos camundongos WT-AA. Com relação à reabsorção óssea, os animais IL10-KO apresentaram um significativo aumento da área entre a junção amelo-cementária (JAC) e a crista óssea alveolar (COA) ao tempo de 30 dias ($p < 0,05$) comparado aos animais WT-AA.

4.15 INFLUENCIA DA CITOCINA ANTI-INFLAMATÓRIA IL-10 NA MODULAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS DE OSTEOCLASTOS NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR *A.a.*

Figura 17 - Cinética de expressão de moléculas co-estimulatórias nos tecidos periodontais de camundongos IL10-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos IL10-KO submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A. actinomycetemcomitans* foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de DAP-12, TREM-2 e SIRP β 1 e FcR γ , OSCAR e PIR-A foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 5 animais nos tempo 7 e 30; e 2 animais no tempo de 0h. Um experimento representativo de três experimentos independentes; * $p < 0.05$ vs WT-AA.

Diferentemente aos resultados obtidos com as citocinas de caráter inflamatória acima analisadas, observamos que todas as moléculas co-estimulatórias de osteoclasto (DAP-12, TREM-2, SIRP β 1 e FcR γ , OSCAR e PIR-A) apresentaram um aumento significativo ao tempo de 7 dias pós-infecção ($p < 0,05$ vs 0h), aumentando ainda mais ao tempo de 30 dias pós-infecção ($p < 0,05$ vs 7 dias) nos camundongos IL10-KO.

Ao compararmos as duas linhagens de camundongos, observamos que ao tempo de 30 dias pós-infecção os camundongos WT-AA apresentaram em todas as moléculas co-estimulatórias analisadas uma expressão significativamente menor ($p < 0,05$), sendo que nas moléculas SIRP β 1 e OSCAR essa diferença significativa já é observada ao tempo de 7 dias ($p < 0,05$).

4.16 RELAÇÃO ENTRE AS RAZÕES DAS MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS E DAS CÉLULAS INFLAMATÓRIAS NAS DIVERSAS LINHAGENS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *A.a.*

Observamos, até o presente momento, uma significativa interferência das citocinas na expressão de mRNA das moléculas co-estimulatórias de osteoclastos e na quantidade de células inflamatórias. Sabendo-se que as moléculas co-estimulatórias de osteoclastos podem apresentar-se na superfície de tais células inflamatórias, nossa análise subsequente foi a relação da quantidade de vezes que a expressão de moléculas co-estimulatórias foi diferente (maior ou menor) em relação às células inflamatórias nos camundongos TNF α -KO, IFN γ -KO, IL17-KO, IL10-KO quando comparadas com os camundongos WT-AA, nos períodos de 7 dias (Fig. 18; Apêndice B) e 30 dias (Fig. 19; Apêndice B).

Figura 18 - Variação da diferença entre os camundongos infectados WT e KOs, para quantidade de células inflamatórias e moléculas co-estimulatórias de osteoclastos, no período de 7 dias. Os gráficos à esquerda indicam a razão entre as médias de células inflamatórias e das moléculas co-estimulatórias dos camundongos WT sobre os camundongos KO. Os gráficos à direita indicam a variação em vezes das moléculas co-estimulatórias de osteoclasto entre camundongos WT e KOs normalizados pela quantidade de células inflamatórias (Apêndice B). Barras acima da linha pontilhada determinam maior variação da expressão de mol. co-estimulatórias em relação as células inflamatórias, barras abaixo da linha pontilhada determinam maior variação de células inflamatórias em relação a expressão de mol. co-estimulatórias, no período de 7 dias.

Os resultados obtidos demonstram que, a ausência da citocina TNF- α no nosso modelo experimental de doença periodontal aos 7 dias apresentou uma variação nas moléculas DAP-12, TREM-2 e OSCAR de aproximadamente 1,5x maior que a variação apresentada nas células inflamatórias, sendo que as outras moléculas variaram de uma maneira muito semelhante (Fig. 18a e 18b). Significando assim, que nos camundongos TNF α -KO, as moléculas co-estimulatórias DAP-12, TREM-2 e OSCAR reduziram em maior número de vezes que a quantidade de células inflamatórias.

Em relação aos camundongos IFN γ -KO, as molécula SIRP β 1 e OSCAR apresentaram uma variação menor que a variação na quantidade de células inflamatórias, as outras moléculas co-estimulatórias analisada apresentaram uma variação na expressão semelhante a variação na quantidade de células inflamatórias quando comparadas aos camundongos WT-AA neste mesmo período de 7 dias (Fig. 18c e 18d). Diferentemente ao ocorrido na relação entre os camundongos IL17-KO e WT-AA, onde observa-se que todas as moléculas co-estimulatórias de osteoclastos apresentaram uma variação menor que as células inflamatórias (Fig. 18e e 18f).

Finalmente ao tempo de 7 dias pós-infecção, observamos pouca diferença entre os resultados na relação IL10-KO e WT-AA entre moléculas co-estimulatórias/células inflamatórias, ou seja tanto a expressão das moléculas co-estimulatórias quanto a quantidade de células inflamatórias aumentaram na ausência de IL-10 de uma forma similar (Fig. 18g e 18h).

Figura 19 - Variação da diferença entre os camundongos infectados WT e KOs, para quantidade de células inflamatórias e moléculas co-estimulatórias de osteoclastos, no período de 30 dias. Os gráficos à esquerda indicam a razão entre as médias de células inflamatórias e das moléculas co-estimulatórias dos camundongos WT sobre os camundongos KO. Os gráficos à direita indicam a variação em vezes das moléculas co-estimulatórias de osteoclasto entre camundongos WT e KOs normalizados pela quantidade de células inflamatórias (Apêndice B). Barras acima da linha pontilhada determinam maior variação da expressão de mol. co-estimulatórias em relação às células inflamatórias, barras abaixo da linha pontilhada determinam maior variação de células inflamatórias em relação a expressão de mol. co-estimulatórias, no período de 30 dias.

Em relação ao período de 30 dias, observamos que, os camundongos TNFp55-KO apresentaram uma variação entre expressão de moléculas co-estimulatórias e quantidade de células inflamatórias muito semelhante, com exceção da molécula FcR γ (Fig. 19a e 19b). Resultados diferentes, observamos na ausência de IFN- γ , onde as moléculas co-estimulatórias de osteoclastos variaram em menor número de vezes quando comparadas a variação de quantidade de células inflamatórias (Fig. 19c e 19d). Demonstrando que em camundongos IFN γ -KO a redução da expressão de moléculas co-estimulatórias de osteoclastos foi menor que a redução na quantidade de células inflamatórias quando comparados com os camundongos WT-AA.

Nos resultados dos camundongos IL17-KO, observamos que a variação WT/KO na expressão de células co-estimulatórias de osteoclastos apresentaram-se maior que a variação na quantidade de células inflamatórias (Fig. 19e e 19f). Sendo que, ausência da citocina inflamatória IL-17 no modelo experimental de doença periodontal aumenta o número de vezes da redução das moléculas co-estimulatórias de osteoclastos em relação às células inflamatórias em no mínimo 1,5x, chegando a uma redução quase 3x maior na molécula FcR γ , quando comparado aos camundongos WT-AA, o qual apresenta tal citocina, no período de 30 dias (Fig. 19f).

Por fim, nossos resultados demonstram que nos camundongos IL10-KO a variação na expressão de todas moléculas co-estimulatórias de osteoclastos apresentou-se maior que a variação na quantidade de células inflamatórias (Fig. 19g e 19h), o que significa neste caso, que a ausência de IL-10 na DP experimental aumenta mais a expressão de moléculas co-estimulatórias de osteoclasto quando comparado com a quantidade de células inflamatórias.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A osteoimunologia é um campo interdisciplinar de pesquisa que é composto pelo estudo do sistema ósseo e sua relação com o sistema imunológico. Atualmente, este campo vem emergindo devido à grande incidência de doenças ósseas inflamatórias, como é o caso da artrite reumatóide e das doenças periodontais (DP) (ARRON; CHOI, 2000; JIMI; GHOSH, 2005; TAKAYANAGI, 2005). Desta forma, fatores osteoclastogênicos, responsáveis diretos pela reabsorção óssea, tornam-se importantes alvos no estudo das doenças periodontais. Sabe-se que, a integridade do tecido ósseo depende da manutenção de um delicado equilíbrio entre reabsorção pelos osteoclastos e a formação óssea pelos osteoblastos. Assim, em tecidos periodontais saudáveis, observa-se um harmônico equilíbrio entre as moléculas RANK/RANKL e OPG (BAKER, 2000; TENG, 2003). Realmente, estudos demonstram que níveis elevados de RANKL são encontrados no fluido gengival e no tecido periodontal em condições de doença, quebrando assim o equilíbrio ósseo entre RANK/RANKL e OPG (BAKER, 2000; TENG et al., 2000; TENG, 2003; MOGI; OTOGOTO, 2007). Como primeiro impacto, a inibição ou bloqueio das moléculas RANK e RANKL aparentam uma solução imediata contra doenças ósseas inflamatórias; porém, estudos demonstram que camundongos geneticamente modificados que não apresentam a molécula RANKL, ou RANK, desenvolvem uma série de problemas, incluindo osteopetrose, deficiência na erupção dentária e deficiência no desenvolvimento dos órgãos linfóides, determinando assim que, a anulação completa e sistêmica destas moléculas surge como um ato inviável, principalmente no caso das DPs (WONG et al., 1999; RAUNER; SIPOS; PIETSCHMANN, 2007).

Mais recentemente, estudos demonstraram que, apesar de fundamental, a ligação RANK/RANKL não é a única necessária para a osteoclastogênese (KOGA et al., 2004; TAKAYANAGI, 2005; HUMPHREY et al., 2006). Dois novos complexos de receptores contendo seis moléculas, dispostas em trios, DAP-12, TREM-2 e SIRP β 1, e FcR γ , OSCAR e PIR-A, são descritos como responsáveis pelo aumento dos níveis de cálcio intracelular, e também apresentam extrema importância para os eventos osteoclastogênicos. Porém, diferentemente de RANK ou RANKL, a

ausência de uma dessas moléculas não cessa por completo a reabsorção óssea, mostrando-se como alvos terapêuticos em potencial para as doenças ósseas, incluindo as DPs. Desta forma, objetivamos aqui o estudo do papel das moléculas co-estimulatórias de osteoclasto e sua modulação por citocinas na doença periodontal experimental em camundongos.

Todavia, antes de qualquer suposição, ou mesmo, antes da caracterização do papel das moléculas co-estimulatórias de osteoclastos em modelos experimentais, é necessário confirmar se nas DPs humanas há a presença exacerbada, ou mesmo a presença de tais moléculas. Estudos demonstram que tais moléculas apresentam-se altamente expressas em doenças ósseo inflamatórias em humanos, como é o caso da artrite reumatóide (AR), doença que apesar de não possuir a mesma etiologia que as DPs, apresenta uma resposta imunológica muito semelhante (BARTOLD; MARSHALL; HAYNES, 2005). Como ao ocorrido com a AR, nosso primeiro resultado demonstrou que no tecido gengival de pacientes portadores de doença periodontal crônica, todas as moléculas co-estimulatórias de osteoclastos investigadas apresentaram-se significativamente mais expressas quando comparadas a tecidos gengivais de pacientes saudáveis. Demonstrando a importância destas moléculas no desenvolvimento da doença periodontal e a necessidade do melhor entendimento do papel das moléculas co-estimulatórias de osteoclastos.

Estudando o quadro complexo das DPs em humanos, observamos que não são somente as moléculas co-estimulatórias apresentam-se altamente expressa nos tecidos infectados, mas também diversos outros mediadores de diferentes características, os quais podem apresentar papéis paradoxais dentro desta patologia. Apesar das moléculas co-estimulatórias apresentarem um papel osteoclastogênico bem definido, não se sabe se o bloqueio ou inibição de alguma destas moléculas participará de forma efetiva na redução da perda óssea alveolar das DPs ou mesmo se participará de algum modo no desenvolvimento desta patologia. Assim, faz-se necessário, a administração de bloqueadores dos receptores ou ligantes do complexo de moléculas co-estimulatórias nos tecidos gengivais humanos, para sabermos qual o potencial terapêutico e eventual papel destas moléculas. Obviamente, faz-se inviável qualquer administração de bloqueadores em humanos sem que haja estudos prévios em modelos

experimentais, ou pelo menos que se conheça de maneira clara os ligantes das moléculas co-estimulatórias ou fármacos específicos desenvolvidos para tal. Além do mais, modelos experimentais nos possibilitam reduzir uma grande quantidade de fatores envolvidos que acabam mascarando ou mesmo confundindo a análise dos resultados. A diferença entre fenótipos inflamatórios e microbiota oral individual de cada paciente, acaba por fim, alterando a real percepção do papel das moléculas co-estimulatórias de osteoclastos na doença periodontal.

Visando conhecer melhor o papel das moléculas co-estimulatórias de osteoclastos, nosso segundo passo foi transpor o estudo para um modelo experimental de DP em camundongos, utilizado diversas vezes por nosso grupo de pesquisa (GARLET et al., 2005; GARLET et al., 2006; GARLET et al., 2007; REPEKE et al., 2010; FERREIRA et al., 2011). Assim, ao inocularmos o periodontopatógeno *A.a.* em camundongos observamos que os animais infectados apresentaram um número de células inflamatórias exacerbada ao decorrer desta patologia, principalmente nos tempos de 15 e 30 dias pós-infecção, período este onde também observou-se um significativo aumento na reabsorção óssea alveolar (GARLET et al., 2006; GARLET et al., 2007; REPEKE et al., 2010; FERREIRA et al., 2011). Realmente, ambos eventos parecem estar interligados, pois uma parcela das células inflamatórias que migram para o tecido gengival infectado, promovem um ambiente favorável a reabsorção óssea, ou apresentam-se como possíveis pré-osteoclastos (REPEKE et al., 2010; FERREIRA et al., 2011).

Diversos tipos celulares caracteristicamente presentes em lesões periodontais humanas, como macrófagos, neutrófilos, e linfócitos podem ser encontrados em números elevados nos tecidos periodontais dos animais infectados (GARLET et al., 2005; FERREIRA et al., 2011). Porém nem todas essas células encontradas participam direta ou indiretamente da reabsorção óssea alveolar e principalmente nem todas as células inflamatórias que migraram para esse tecido apresentam moléculas co-estimulatórias em sua constituição (GARLET et al., 2005; RAUNER; SIPOS; PIETSCHMANN, 2007; FERREIRA et al., 2011). Ao caracterizarmos as células inflamatórias em nosso modelo, no período de pico (30 dias), observamos que aproximadamente 25% delas apresentavam positividade para os receptores CD115, receptor do fator estimulador de colônias de monócitos/macrófagos (M-CSF) importante na diferenciação e sobrevivência de pré-

osteoclastos, e RANK, molécula fundamental na osteoclastogênese. Sugerindo desta forma que, nem todas as células que apresentavam esses dois receptores fundamentais em pré-osteoclastos apresentavam-se positivas para todas as moléculas co-estimulatórias de osteoclasto, e que possivelmente nem todos os pré-osteoclasto necessariamente precisem das seis moléculas co-estimulatórias para diferenciar-se em osteoclastos (KAIFU et al., 2003; MOCSAI et al., 2004). Por outro lado, as duas moléculas acessórias, DAP-12 e FcR γ , apresentaram uma porcentagem de positividade maior que CD115 e RANK dentro das células inflamatórias analisadas, demonstrando que não apenas as células que irão se tornar osteoclastos apresentam em suas membranas moléculas co-estimulatórias (SATO et al., 1993; LACEY et al., 1998).

Visto isto, faz-se interessante analisar a positividade das moléculas co-estimulatórias de osteoclastos em diferentes tipos de células inflamatórias presentes no tecido gengival dos camundongos infectados. De acordo com resultados anteriores do nosso grupo (SILVA et al., 2005; CLAUDINO et al., 2008), foi demonstrado que, uma grande parcela das células inflamatórias CCR2 $^{+}$ presentes no tecido gengival de camundongos com DP experimental caracterizavam-se por macrófagos/monócitos, células oriundas do mesmo tecido embrionário que os osteoclastos e possíveis pré-osteoclastos *in vivo*. Observamos que comparado com as células inflamatórias de maneira geral, as células CCR2 $^{+}$ apresentaram uma quantidade maior não só de moléculas co-estimulatórias, mas também dos receptores para RANKL e M-CSF. Ressaltando que nem todas as células positivas para CCR2 são monócitos, macrófagos ou possíveis candidatos a se diferenciarem em osteoclastos. De fato, diversas outras células, como linfócitos, também podem apresentar tal receptor em suas membranas (WEBB et al., 2008).

Outra célula presente de maneira significativa nos tecidos gengivais de camundongos infectados por A.a. são as células CCR5 $^{+}$ (REPEKE et al., 2010; FERREIRA et al., 2011; REPEKE et al., 2011). Estudos demonstram através de imunohistoquímica que células T, macrófagos e células dendríticas no tecido gengival inflamado expressam o receptor CCR5 (JOTWANI; MUTHUKURU; CUTLER, 2004). Resultados publicados pelo nosso grupo de pesquisa, demonstram que aos 30 dias de DP experimental, células CCR5 $^{+}$ co-expressam três receptores de maneira intensa: CXCR3 e CD3, sugerindo que uma importante parcela das

células correspondem a células Th1; e F4/80, característico de macrófagos (O'GARRA; McEVOY; ZLOTNIK, 1998). Desta forma, células CCR5+ surgem como potenciais células que constituem em suas membranas moléculas co-estimulatórias de osteoclastos, sugestão esta comprovada através de nossos resultados. Mesmo com uma porcentagem de positividade para os marcadores analisados menor quando comparados as células CCR2+, as células CCR5+ presentes nos tecidos gengivais demonstram ser células potenciais na osteoclastogênese. Ressaltando que, não necessariamente células que apresentem em suas membranas celulares moléculas co-estimulatórias de osteoclasto, irão se diferenciar em um osteoclasto maduro ou se quer apresentem-se como um pré-osteoclasto, já que a função desempenhada por tais moléculas é de aumento dos níveis de cálcio intracelular. De fato, outras funções além da osteoclastogênese são atribuídas a moléculas co-estimulatórias, como a ativação de linfócitos B e T através da relação destas moléculas com o aumento na produção de receptores de células T (TCR) e receptores de células B (BCR), além de ativar células NK e ser responsáveis por sinapses nervosas (HAMERMAN et al., 2009).

Sabendo disto, analisamos a presença das moléculas co-estimulatórias em células que não caracterizam-se como possíveis células geradoras de osteoclastos ou que participem de forma direta da reabsorção óssea alveolar. Estudos anteriores, demonstram que o receptor CCR4, caracteristicamente está associado à migração de linfócitos com fenótipo Th2. Estas células, desempenham nas DPs um papel de conter a reabsorção óssea principalmente através de citocinas anti-inflamatórias, como é o caso de IL-4 e IL-10, não apresentando nenhum relato ou possibilidade de diferenciarem-se em osteoclastos. Assim, ao analisarmos a presença de moléculas co-estimulatórias de osteoclastos nas células CCR4+, as quais migraram para o tecido periodontal infectado no camundongo WT, observamos uma reduzida positividade, com exceção da molécula FcR γ quando comparada as demais células analisadas. De fato, estudos demonstram que células do tipo Th, dentre elas do subtipo Th2 e Tregs, apresentam dupla positividade para FcR γ e CCR4 (HIDA et al., 2009).

Mesmo sabendo que as moléculas co-estimulatórias de osteoclasto possivelmente possuam diversos outros papéis os quais não estão relacionados a reabsorção óssea ou a osteoclastogênese, ao observarmos a cinética das células

que apresentam em sua constituição tais moléculas, percebemos que o pico de células CCR2+ e CCR5+ vai de acordo ao período onde foi relatado o começo da maior intensidade de reabsorção óssea, período de 15 dias. Também observamos, que ao tempo de 30 dias, onde obtivemos o maior número de células inflamatórias, aparentemente apresentou-se como um período de transição entre uma resposta com células de características mais inflamatória (macrófagos, linfócitos Th1), para uma resposta de características celulares de menor intensidade inflamatória e de reabsorção, células Th2 (CCR4+). De fato, diversos estudos demonstram que as DPs a um certo ponto de seu desenvolvimento imunológico observamos uma tendência de mudança de característica, tentando desta forma, diminuir/controlar a reabsorção óssea alveolar e mesmo a resposta inflamatória (TENG, 2003; GARLET, 2010).

Fato este, observado não somente nas cinéticas de reabsorção óssea ou das células inflamatórias, mas também na expressão de agentes osteoclastogênicos do nosso modelo experimental de DP. A presença de RANKL, bem como do marcador de reabsorção óssea catepsina K, é observada em nossos resultados apresentando um aumento intenso no período de 15 dias, justamente no pico das células inflamatórias CCR5+ e CCR2+, e no auge da intensidade da reabsorção óssea alveolar. Em relação a expressão de OPG, um receptor “decoy” de RANK, observamos maiores níveis em tempos posteriores do decorrer da DP experimental, juntamente com a cinética de células CCR4+, mostrando-se como uma resposta no controle da reabsorção alveolar (TAKAYANAGI, 2005; TAKAYANAGI, 2005).

Assim, tendo em vista que, caracterizamos a cinética de reabsorção óssea alveolar e de células inflamatórias, demonstrando quais delas eram positivas para moléculas co-estimulatórias de osteoclastos e qual o momento em que cada uma faz-se presente nos tecidos gengivais infectados basta-nos, como próximo passo, analisar de fato a cinética de expressão das seis moléculas co-estimulatórias e compará-las a tecidos gengivais sadios.

A primeira molécula co-estimulatória de osteoclasto a ser analisada foi a molécula DAP-12. Estudos demonstram que a diferenciação de osteoclastos *in vitro* é severamente inibida na ausência de DAP-12, uma molécula de membrana adaptadora que contém um *motif* ITAM que ativa a sinalização de cálcio em células do sistema imunológico (KAIFU et al., 2003; KOGA et al., 2004). Além do mais, a

expressão de DAP-12 apresenta-se elevada em modelos de artrite reumatóide em camundongos (BARTOLD; MARSHALL; HAYNES, 2005). De forma similar, nossos resultados demonstram que em camundongos infectados por *A.a.* apresentaram uma expressão de DAP-12 significativamente maior quando comparados aos camundongos WT não infectados no decorrer de todos os tempos analisados. Porém, apesar de DAP-12 mostrar-se uma molécula importante em doenças inflamatórias ósseas, como a artrite reumatóide, e apresentar expressões elevadas na doença periodontal experimental, camundongos deficientes de DAP-12 (DAP12-KO) não exibem uma ausência total de osteoclastos no tecido ósseo (KAIFU et al., 2003), sugerindo que outras moléculas podem apresentar papel homólogo à DAP-12.

Alternativamente, a molécula FcR γ também possui um motif ITAM que sinaliza a mesma via cálcio/calcineurina, e dessa forma poderia compensar a falta de DAP-12. Além do mais, semelhante à cinética de DAP-12, nossos resultados demonstram um aumento de expressão de FcR γ nos camundongos portadores de DP experimental. Em doenças inflamatórias ósseas, FcR γ parece ter um papel importante já que se apresenta em altos níveis, como é o caso do líquido sinovial de pacientes portadores de AR (WENINK et al., 2009). Além do fato de camundongos deficientes das duas moléculas (DAP12-KO/FcR γ -KO) apresentarem uma severa osteopetrose devido a uma perda efetiva na diferenciação de osteoclastos, evidenciando que a sinalização ITAM via uma dessas moléculas (DAP-12 e FcR γ) é indispensável para no programa de diferenciação de osteoclastos (TEDLA et al., 2002).

DAP-12 e FcR γ são proteínas transmembrana que se associam a receptores na superfície da célula para que o processo de sinalização possa ser disparado. Para tanto, DAP-12 se associa a TREM-2 e SIRP β 1, enquanto FcR γ se associa a OSCAR e PIR-A (TAKAYANAGI, 2005; HUMPHREY et al., 2006). Diversos estudos mostram que essas proteínas, chamadas de moléculas co-estimulatórias de osteoclastos, desempenham papéis indispensáveis para a osteoclastogênese e vêm sendo inseridas em um contexto de ativação patológicas dos osteoclastos em doenças inflamatórias (KAIFU et al., 2003; MOCSAI et al., 2004; KIM et al., 2005; HUMPHREY et al., 2006; KIM et al., 2008; WENINK et al., 2009). Realmente, amostras de líquido sinovial de pacientes portadores de AR

apresentam alta expressão de moléculas co-estimulatórias, como é o caso de PIR-A e OSCAR (TEDLA et al., 2002; BARTOLD; MARSHALL; HAYNES, 2005). Além do mais, alterações genéticas em OSCAR estão associadas ao aumento no risco de osteoporose pós-menopausa (KIM et al., 2005). Assim como, receptores associados à molécula adaptadora DAP-12, como é o caso de TREM-2, apresentar mutações em seu gene associado a uma doença que afeta o tecido ósseo, a doença de Nasu-Hakola (KONDO et al., 2002). De uma maneira similar às doenças ósseas, moléculas co-estimulatórias de osteoclasto possuidoras de domínios transmembrana, TREM-2, SIRP β 1, OSCAR e PIR-A, parecem estar associados de alguma forma ao desenvolvimento das DPs, já que nossos resultados apresentaram expressão aumentada nos tecidos periodontais de camundongos WT quando induzidos DP através da inoculação de *A.a*.

Apesar das associações com patologias ósseas inflamatórias e com os resultados por nós encontrados, pouco se sabe sobre o exato mecanismo envolvido na atuação das moléculas co-estimulatórias de osteoclastos, de seus ligantes, e de como sua expressão é modulada positiva ou negativamente. Sabe-se que citocinas que estão abundantemente expressas em tais doenças, e que direta ou indiretamente fazem parte de eventos osteoclastogênicos, podem atuar de alguma forma na expressão destas moléculas co-estimulatórias (BARTOLD; MARSHALL; HAYNES, 2005; GARLET et al., 2006; HERMAN et al., 2008). Neste sentido, analisamos a expressão de citocinas pró- e anti- inflamatórias clássicas que comprovadamente apresentam-se alteradas na patogênese das doenças ósseas (GRAVES; COCHRAN, 2003; TAKAHASHI et al., 2005; GARLET et al., 2007; GARLET et al., 2008). Uma delas é o TNF- α , uma citocina pró-inflamatória altamente expressa em doenças como artrite reumatóide e doença periodontal, apresentando papel importante na reabsorção óssea, já que possui a capacidade aumentar a expressão de RANKL, além de mediar a osteoclastogênese através da citocina IL-1, aumentando a expressão, não só da própria IL-1, como também de seu receptor IL-1RI (WEI et al., 2005; HERMAN et al., 2008; KIM et al., 2008). Semelhante ao TNF- α , o IFN- γ também apresenta altos níveis nos tecidos gengivais com doença periodontal, e está associada com a progressão das lesões e o aumento da severidade da doença. De fato, estudos em camundongos claramente demonstram que IFN- γ está envolvido no desenvolvimento da reação inflamatória e na

reabsorção óssea na DP experimental (SCHRODER et al., 2004; GARLET et al., 2008).

Interessantemente, ao analisarmos as cinéticas de expressão das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IFN- γ) nos camundongos WT-AA portadores de DP experimental observamos que, no mesmo período que houve um aumento significativo na expressão destas citocinas, a expressão das moléculas co-estimulatórias (DAP-12, FcR γ e PIR-A) apresentaram-se aumentadas, sugerindo assim uma possível interferência no mecanismo de expressão. Diferentemente ao observado na cinética de expressão das moléculas co-estimulatórias de osteoclastos TREM-2, SIRP β 1 e OSCAR, que se assemelha muito com a cinética de expressão da citocina IL-17, uma citocina pró-inflamatória característica de células Th17 capaz de aumentar a expressão de TNF- α , IL-1 β e RANKL gerando assim um loop de amplificação na resposta inflamatória (BEKLEN et al., 2007; KRAMER; GAFFEN, 2007; YU et al., 2008). Adicionalmente, a expressão de TREM-2, SIRP β 1, OSCAR e IL-17 veem ao encontro da cinética da reabsorção óssea alveolar nos camundongos infectados em nosso modelo de estudo de DP, sugerindo uma íntima relação entre IL-17, moléculas co-estimulatórias de osteoclasto e reabsorção óssea alveolar .

Apesar do indiscutível papel das citocinas na osteoclastogênese, no desenvolvimento da doença periodontal, na presença exacerbada das moléculas co-estimulatórias por nós identificados nos tecidos periodontais de camundongos infectados por *A.a.* e pela semelhança na cinética entre citocinas e moléculas co-estimulatórias de osteoclastos no desenvolvimento da DP em camundongos, ainda não podemos afirmar em um sentido concreto o real papel de determinada citocina na modulação da expressão das moléculas co-estimulatórias na DP experimental. Porém com os resultados, até agora, obtivemos subsídios que possivelmente há alguma inter-relação entre citocinas e moléculas co-estimulatórias de osteoclastos nas doenças periodontais. Assim, para evidenciar esta relação utilizamos camundongos geneticamente modificados, que não apresentam as citocinas [TNF- α (receptor p55), IFN- γ , IL-17 e IL-10], afim de observar as possíveis modulações ou interferências destas citocinas na expressão das moléculas co-estimulatórias na DP experimental.

O primeiro camundongo utilizado foi o geneticamente deficiente para o receptor p55 da citocina TNF- α (TNFp55-KO). Diversos estudos demonstram a

relação entre a citocina TNF- α e a severidade das DPs, utilizando inúmeros métodos científicos e diferentes modelos animais (ROSSOMANDO; KENNEDY; HADJIMICHAEL, 1990; OATES; GRAVES; COCHRAN, 2002; GRAVES; COCHRAN, 2003; GARLET et al., 2007). Também, faz-se claro que a ausência ou bloqueio desta citocina inibe a perda óssea alveolar e diminui a intensidade da reação inflamatória de uma maneira geral (OATES; GRAVES; COCHRAN, 2002; GARLET et al., 2007). Não diferente, nossos resultados demonstram que a ausência do receptor p55, anulando o papel inflamatório de TNF- α , reduz de maneira intensa a reabsorção óssea alveolar e a quantidade de células inflamatórias no tecido gengival dos camundongos infectados.

Porém, apesar da evidente redução nos índices de severidade da doença periodontal, a relação direta entre TNF- α e a modulação das moléculas co-estimulatórias de osteoclasto permanece nebuloso dentre os trabalhos publicados. Estudos *in vitro* com monócitos e neutrófilos humanos, demonstram uma associação de TREM-1, uma molécula também associada a DAP-12, com um acréscimo moderado na produção de TNF- α (BOUCHON; DIETRICH; COLONNA, 2000; ORMSBY et al., 2011). Em contrapartida, estudos em macrófagos deficientes para DAP-12 apresentam uma significativa produção de citocinas quando desafiadas por LPS, sugerindo um papel inibitório *in vitro* de DAP-12 em receptores do tipo Toll (TLR). Sugestão esta que é confirmada através de alguns estudos utilizando camundongos geneticamente deficientes, onde tanto camundongos deficientes para DAP-12, quanto para TREM-2, apresentaram maiores níveis de TNF- α quando desafiados por LPS, zimosan ou CpG bacteriano. Interessantemente que, pacientes humanos portadores de Nasu-Hakola, os quais apresentam uma mutação recessiva no gene responsável pela transcrição de TREM-2, inativando-o, não apresentam nenhuma alteração no sistema imunológico, apenas no sistema ósseo e alterações cerebrais (TOMASELLO; VIVIER, 2005). Além do mais, tanto o complexo de moléculas DAP-12, TREM-2 e SIRP β 1, quanto FcR γ , OSCAR e PIR-A, participam da ativação de células do sistema imune, como é o caso de células dendríticas e demais células fagocitárias, as quais são responsáveis por significativa produção de TNF- α em tecidos inflamados (TAKAYANAGI, 2005; RAUNER; SIPOS; PIETSCHMANN, 2007).

Mesmo algumas moléculas co-estimulatórias de osteoclasto parecer regular negativamente a citocina TNF- α , o contrário não é demonstrado; não se sabe ao certo se TNF- α pode de alguma forma modular alguma das moléculas co-estimulatórias. Sabe-se que, TNF- α aumenta de forma direta e indireta a produção de RANKL e de seu receptor RANK, e estes sim demonstram-se em correlação positiva com a expressão das moléculas co-estimulatórias (TAKAYANAGI, 2005; CATRINA et al., 2006; TAKAYANAGI, 2007). De fato, nossos resultados demonstraram que a ausência de TNF- α na DP experimental promove uma redução significativa na expressão de moléculas co-estimulatórias de osteoclastos. Porém, apesar do resultado encontrado, não podemos afirmar de maneira categórica uma interação direta entre TNF- α e qualquer uma das moléculas co-estimulatórias, já que esta citocina pode atuar de diversas maneiras e por vias indiretas na expressão de tais moléculas. Outro fato a ser considerado, é que a ausência de TNF- α reduziu de maneira significativa a quantidade de células inflamatórias no tecido gengival infectado, sendo que, como demonstrado, grande parte destas células possuem em sua constituição moléculas co-estimulatórias de osteoclastos. Assim, não se sabe se a redução na expressão de todas as moléculas co-estimulatórias de osteoclasto se dá por uma interação direta com TNF- α , pela simples redução na quantidade de células no tecido gengival, ou por ambas razões. Visto isto, comparamos de forma simples, se a redução das células inflamatórias foi maior ou menor que a redução das moléculas co-estimulatórias na ausência de TNF- α . Em nossos resultados observamos que, no período de 7 dias pós-infecção, a redução das moléculas co-estimulatórias (DAP-12, TREM-2 e OSCAR) apresentaram-se de 1,5 a 2 vezes maior que a redução da quantidade de células inflamatórias, diferentemente do período de 30 dias, onde observamos uma redução relativamente semelhante. Interessantemente que, neste mesmo período (7 dias) a citocina TNF- α no tecido gengival infectado apresenta-se em sua maior expressão dentro do desenvolvimento da DP experimental, reduzindo de forma significativa no período de 30 dias. Entretanto, mesmo com esta forte sugestão de modulação positiva de TNF- α para com as moléculas co-estimulatórias DAP-12, TREM-2 e OSCAR, precisamos entender que a análise de redução das moléculas co-estimulatórias foi realizada na quantidade de expressão de mRNA, e que apesar de ser um indicio palpável, não necessariamente todo mRNA traduzirá uma nova proteína, podendo desta forma, TNF- α interferir também no processo pós transcrição destas moléculas.

Similar a TNF- α , a citocina IFN- γ , apresenta-se associada ao aumento da severidade de doenças periodontais. IFN- γ demonstra um papel caracteristicamente inflamatório, aumentando não só a expressão de citocinas como TNF- α , mas também a de quimiocinas responsáveis pela migração de leucócitos nas doenças periodontais. De acordo, camundongos geneticamente modificados para não apresentar IFN- γ , apresentaram uma significativa redução, tanto no número de células inflamatórias, quanto da reabsorção óssea, quando comparados aos camundongos WT infectados. Em relação a moléculas co-estimulatórias de osteoclasto, de maneira parecida com TNF- α , estudos demonstram que a produção de IFN- γ é aumentada, *in vitro* e *in vivo* quando desafiado, na ausência de algumas moléculas co-estimulatórias (DAP-12, TREM-2 e FcR γ). Mesmo assim, não se sabe ao certo se a ausência de IFN- γ promove o mesmo papel em tais moléculas.

Em nosso modelo de doença periodontal, observamos que camundongos que não apresentam IFN- γ portadores de DP, obtiveram uma redução significativa em todas as moléculas co-estimulatórias de osteoclastos em todos os tempos analisados, com exceção de SIRP β 1 no tempo de 7 dias. Porém, igualmente ao ocorrido com TNF- α , não sabemos se a redução se deu como uma inibição de IFN- γ frente às moléculas co-estimulatórias ou devido a redução no número de células inflamatória no tecido gengival infectado.

Desta vez, diferentemente ao ocorrido com TNF- α , observamos que ao tempo de 7 dias pós-infecção, os camundongos IFN γ -KO apresentaram uma redução, em vezes, na expressão de moléculas co-estimulatórias de osteoclastos muito semelhante a redução de células inflamatórias, sendo que, aparentemente as moléculas SIRP β 1 e OSCAR não reduziram tanto quanto as células inflamatórias. Entretanto, no período de 30 dias observa-se que, com exceção de FcR γ , a expressão das moléculas co-estimulatórias reduziram em quantidade menor que as células inflamatórias em camundongos IFN γ -KO, sugerindo desta forma uma possível regulação negativa de IFN- γ frente as moléculas co-estimulatórias.

Interessantemente que, apesar de IFN- γ apresentar *in vivo* um papel semelhante ao de TNF- α , promovendo *in vivo* a migração de células inflamatórias e a reabsorção óssea alveolar, este papel apresenta-se oposto *in vitro* (GARLET et al., 2008). IFN- γ apresenta-se como forte inibidor da osteoclastogênese *in vitro*, interferindo na sinalização intracelular de RANKL, através da diminuição da

expressão do fator de transcrição TRAF6 via Stat1. Hipoteticamente, IFN- γ dentro da doença periodontal, pode atuar, de maneira direta, inibindo as moléculas co-estimulatórias de osteoclasto, via RANKL ou através de uma via desconhecida, porém indiretamente aumentando a reabsorção óssea alveolar, através do aumento de células inflamatórias e de diversos outros mediadores, também inflamatórios.

Outra citocina que vem se destacando no cenário das doenças periodontais é IL-17. Mais recentemente descoberta, IL-17 apresenta uma cinética de expressão diferente das citocinas TNF- α e IFN- γ na DP, aumentando ao decorrer do desenvolvimento da patologia. Mesmo assim, esta intimamente ligada a produção de RANKL e conseqüentemente a osteoclastogênese. Os resultados demonstram que os camundongos IL17-KO com DP experimental apresentam uma forte tendência a redução das células inflamatórias quando comparados aos WT, e uma tendência a reabsorção óssea alveolar nos períodos mais tardios da DP experimental, acompanhando a cinética de expressão de IL-17. Mesmo nossos resultados demonstrando que a fase de maior reabsorção óssea é acometida nos períodos de 7 e 15 dias pós-infecção, período este onde observa-se uma grande expressão de TNF- α e IFN- γ , a reabsorção óssea continua de forma mais amena no período pós 15 dias, sugerindo uma participação importante da citocina IL-17. De fato, ao analisarmos a cinética de expressão de moléculas co-estimulatórias de osteoclastos nos camundongos IL17-KO, observamos no período de 30 dias uma grande redução na expressão das seis moléculas (DAP-12, TREM-2, SIRP β 1, FcR γ , OSCAR e PIR-A), comparado aos camundongos WT infectados. Resultado este que, corrobora com os achados na relação entre as razões de moléculas co-estimulatórias e células inflamatórias. Aos 30 dias pós-infecção, observamos que, com exceção de SIRP β 1, todas as moléculas co-estimulatórias de osteoclasto reduziram mais que as células inflamatórias na ausência de IL-17, sendo que OSCAR e FcR γ chegaram a reduzir de 2,5 a 3 vezes mais. Isto sugere que de alguma forma a citocina IL-17 pode interferir positivamente na modulação da expressão de moléculas co-estimulatórias de osteoclastos. Lembrando que, a análise de variação das moléculas co-estimulatórias foi realizada na quantidade de expressão de mRNA das moléculas co-estimulatórias, sendo necessário diversos outros experimentos para comprovar uma ação celular direta de IL-17 na produção destas moléculas.

Semelhante a cinética de expressão de IL-17 na DP experimental, porém com características opostas, IL-10 apresenta-se como uma potente citocina anti-inflamatória que inibe tanto uma resposta imunoproliferativa quanto uma resposta inflamatória óssea (MOHAMED et al., 2007; MENEZES et al., 2008). Estudos com camundongos deficientes para IL-10 demonstram aumento nos índices de severidade de doenças ósseas inflamatórias, como artrite reumatóide e doenças periodontais (BARTOLD; MARSHALL; HAYNES, 2005; CLAUDINO et al., 2008; KOBAYASHI et al., 2011). De acordo, diferentemente das outras citocinas analisadas, nossos resultados demonstram uma maior quantidade de células inflamatórias e reabsorção óssea alveolar no camundongos IL10-KO portadores de DP experimental, principalmente nos períodos mais tardios do desenvolvimento da DP experimental, pós 15 dias, onde a expressão de IL-10 nos camundongos WT apresenta-se maior.

Realmente, IL-10 parece inibir a osteoclastogênese, principalmente nos estágios iniciais da diferenciação do pré-osteoclasto em osteoclasto (JIMI; GHOSH, 2005). Além do mais, a presença de IL-10 induz a produção de uma proteína chamada SOCs que inibe a sinalização intracelular de citocinas responsáveis pela ativação do fator de transcrição NFkB, fator responsável por diversos papéis de caráter inflamatório, dentre eles a osteoclastogênese (JIMI; GHOSH, 2005; MENEZES et al., 2008).

Em relação às moléculas co-estimulatórias de osteoclastos, da mesma forma que DAP-12 e TREM-2 parecem inibir TNF- α e IFN- γ , essas mesmas moléculas parecem aumentar a produção de IL-10 (WHITTAKER et al., 2010; SUMPTER et al., 2011). Porém, o oposto parece não acontecer *in vitro*; IL-10 demonstra não regular a expressão de DAP-12 ou FcR γ em células RAW264.7 (células utilizadas *in vitro* notadas como pré-osteoclastos), nem mesmo do receptor RANK ou moléculas como TRAF6 (EVANS; FOX, 2007). De forma interessante, apesar de IL-10 não parecer modular essas duas moléculas co-estimulatórias de osteoclasto, o mesmo IL-10, no mesmo experimento, demonstrou reduzir a expressão de NFATc1 e o metabolismo de cálcio intracelular (EVANS; FOX, 2007). Ao analisarmos a expressão de moléculas co-estimulatórias de osteoclastos na DP experimental, observamos que a ausência de IL-10 aumenta significativamente a quantidade das seis moléculas co-estimulatórias no período de 30 dias. Além do

mais, no mesmo período de 30 dias, onde observamos uma alta expressão de IL-10 no tecido gengival infectado, observamos que, com a ausência de IL-10 nos camundongos KO, o número de células inflamatórias aumentaram de 1,7 a 3 vezes mais que a expressão de moléculas co-estimulatórias. Sugerindo, desta forma, que IL-10 no nosso modelo de DP experimental, de alguma maneira pode modular negativamente a expressão de moléculas co-estimulatórias de osteoclasto, reforçando ainda mais seu poder anti osteoclastogênico.

Mesmo assim, para desenvolvermos uma estratégia válida para confirmar o exato papel que as diversas citocinas influenciariam na produção de moléculas co-estimulatórias de osteoclastos e por quais vias intracelulares esta possível interferência atuaria, necessitaríamos não somente de camundongos geneticamente modificados para tais citocinas, mas também, camundongos geneticamente modificados para não produzir as seis moléculas co-estimulatórias analisadas. Caso este não viável, pois nem todas as moléculas analisadas possuem camundongos *Knockout* (KO), e as que possuem ainda são de difícil acesso. Entretanto, de uma forma geral, podemos afirmar que citocinas de diferentes características interferem na severidade da doença periodontal, a qual as moléculas co-estimulatórias estão intimamente ligadas.

Em uma visão amplificada do quadro de desenvolvimento da DP (Fig. 20), as moléculas co-estimulatórias de osteoclastos aparecem expressas de forma intensa na DP crônica em humanos e desde o início do desenvolvimento da DP em camundongos, semelhante à reabsorção óssea alveolar. Além do mais, células inflamatórias responsáveis pela reabsorção óssea alveolar na DP apresentam em sua constituição moléculas co-estimulatórias de osteoclastos, e demonstram uma cinética de migração que vai de acordo com o aumento de intensidade da reabsorção óssea alveolar e com o aumento da expressão das moléculas co-estimulatórias, confirmando a importância destas moléculas na osteoclastogênese.

Figura 20 - Figura representativa do mecanismo de ação das citocinas na doença periodontal experimental. Demonstração da infecção oral por A.a. em camundongos, seguido pela produção de mediadores inflamatórios pelas células inflamatórias do tecido gengival e a influência das citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-10 e IL-17 nas moléculas co-estimulatórias de osteoclastos e nos índices de severidade das DPs, no decorrer do desenvolvimento desta patologia.

Apesar de poucos relatos de modulação de citocinas por moléculas co-estimulatórias, nossos resultados demonstraram que há fortes indícios de modulação de moléculas co-estimulatórias por citocinas na DP, sendo que, no início do desenvolvimento da doença periodontal a citocina TNF-α parece modular as moléculas co-estimulatórias de osteoclastos positivamente, assim como modula positivamente a migração de células inflamatórias para o tecido gengival infectado e a reabsorção óssea alveolar. Diferentemente da citocina IFN-γ, que apesar de modular também positivamente a resposta inflamatória e a reabsorção óssea alveolar na DP, parece de uma forma geral, interferir negativamente nas moléculas co-estimulatórias de osteoclastos.

Em períodos mais tardios do desenvolvimento da DP, onde IL-17 e IL-10 apresentam-se mais expressos, observamos que IL-17 demonstra uma forte tendência em aumentar a reabsorção óssea alveolar e a migração de células

inflamatórias para o tecido gengival. Assim como, aparenta modular de forma positiva as moléculas co-estimulatórias de osteoclasto, com exceção de FcR γ . Por fim, a citocina anti-inflamatória IL-10, apresenta um intenso papel na diminuição da resposta inflamatória e reabsorção óssea alveolar na DP e parece, de alguma forma regular negativamente as moléculas co-estimulatórias de osteoclastos.

Interessantemente, apesar dos indícios de modulação das moléculas co-estimulatórias pelas citocinas, de forma geral as citocinas no contexto da DP em camundongos, modula de forma mais ostensiva a migração de células inflamatórias e a reabsorção óssea alveolar, mascarando a modulação direta perante as moléculas co-estimulatórias. Fato que, compromete o entendimento real do sistema citocina/moléculas co-estimulatórias, mas de maneira alguma descarta futuros estudos visando estratégias moduladoras da reabsorção óssea através do bloqueio de alguma das moléculas co-estimulatória de osteoclasto.

Obviamente, não podemos concluir que o bloqueio de alguma destas moléculas co-estimulatórias de osteoclastos amenize de forma eficaz os índices de severidade da DP em humanos, ou mesmo em camundongos. Muito menos propor este bloqueio como próximo passo no desenvolvimento terapêutico das DPs. Entretanto, considerando o conjunto de resultados aqui apresentados, podemos sugerir que interferir terapeuticamente no sistema de interação moléculas co-estimulatórias de osteoclastos/citocinas pode ser uma estratégia interessante no controle das doenças periodontais.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- A expressão das moléculas co-estimulatórias de osteoclastos (DAP-12, TREM-2 e SIRP β 1; e FcR γ , OSCAR e PIR-A) apresentou-se aumentada nos tecidos gengivais de pacientes humanos portadores de doença periodontal crônica.
- A expressão das moléculas co-estimulatórias de osteoclastos (DAP-12, TREM-2 e SIRP β 1; e FcR γ , OSCAR e PIR-A) apresentou-se aumentada nos tecidos gengivais de camundongos infectados por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
- A expressão das moléculas co-estimulatórias de osteoclasto DAP-12, PIR-A e FcR γ , nos camundongos WT-AA apresentou uma cinética de expressão semelhante a TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , RANKL e catepsina K nos camundongos com DP experimental. Em contra partida, a expressão de TREM-2, OSCAR e SIRP β 1 apresentou um aumento gradual no desenvolvimento da DP experimental, alcançando maiores níveis nos períodos mais tardios e apresentando similaridade com a cinética de IL-17 e com reabsorção óssea alveolar.
- Camundongos TNF α -KO, IFN γ -KO e IL17-KO, apresentaram menores níveis de expressão de moléculas co-estimulatórias de osteoclastos, no decorrer do desenvolvimento da DP experimental quando comparados com os camundongos WT infectados por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Diferentemente dos camundongos IL10-KO, os quais apresentaram maior expressão de moléculas co-estimulatórias de osteoclasto.
- Camundongos TNF α -KO (no período inicial) e IL17-KO (no período final) apresentaram uma redução maior na expressão de moléculas co-estimulatórias do que na quantidade de células inflamatórias quando comparadas aos camundongos WT portadores de DP experimental. Enquanto camundongos IFN γ -KO e IL10-KO uma redução menor na

expressão de moléculas co-estimulatórias de osteoclastos do que na quantidade de células inflamatórias quando comparados com os camundongos WT portadores de DP experimental.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Arron JR, Choi Y. Bone versus immune system. *Nature*. 2000 Nov 30;408(6812):535-6.

Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2000 Aug;2(10):1181-92.

Barrow AD, Raynal N, Andersen TL, Slatter DA, Bihan D, Pugh N, et al. OSCAR is a collagen receptor that costimulates osteoclastogenesis in DAP12-deficient humans and mice. *The Journal of clinical investigation*. 2011 Sep;121(9):3505-16.

Bartold PM, Marshall RI, Haynes DR. Periodontitis and rheumatoid arthritis: a review. *Journal of periodontology*. 2005 Nov;76(11 Suppl):2066-74.

Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Gurgan C, Sorsa T, Konttinen YT. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *Journal of dental research*. 2007 Apr;86(4):347-51.

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews*. 2000 Oct;1(1):11-21.

Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol*. 2000 May 15;164(10):4991-5.

Catrina AI, af Klint E, Ernestam S, Catrina SB, Makrygiannakis D, Botusan IR, et al. Anti-tumor necrosis factor therapy increases synovial osteoprotegerin expression in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2006 Jan;54(1):76-81.

Chiu YH, Mensah KA, Schwarz EM, Ju Y, Takahata M, Feng C, et al. Regulation of human osteoclast development by dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP). *J Bone Miner Res*. 2012 Oct 10.

Claudino M, Trombone AP, Cardoso CR, Ferreira SB, Jr., Martins W, Jr., Assis GF, et al. The broad effects of the functional IL-10 promoter-592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3, and OPG expression and their association with periodontal disease outcome. *Journal of leukocyte biology*. 2008 Dec;84(6):1565-73.

Davies A, Cifaldi MA, Segurado OG, Weisman MH. Cost-Effectiveness of Sequential Therapy with Tumor Necrosis Factor Antagonists in Early Rheumatoid Arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2008 Nov 15.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997 May 30;89(5):747-54.

Ernst CW, Lee JE, Nakanishi T, Karimbux NY, Rezende TM, Stashenko P, et al. Diminished forkhead box P3/CD25 double-positive T regulatory cells are associated with the increased nuclear factor-kappaB ligand (RANKL+) T cells in bone resorption lesion of periodontal disease. *Clinical and experimental immunology*. 2007 May;148(2):271-80.

Evans KE, Fox SW. Interleukin-10 inhibits osteoclastogenesis by reducing NFATc1 expression and preventing its translocation to the nucleus. *BMC Cell Biol*. 2007;8:4.

Ferreira SB, Jr., Repeke CE, Raimundo FM, Nunes IS, Avila-Campos MJ, Ferreira BR, et al. CCR5 mediates pro-osteoclastic and osteoclastogenic leukocyte chemoattraction. *J Dent Res*. 2011 May;90(5):632-7.

Ferreira SB, Jr., Trombone AP, Repeke CE, Cardoso CR, Martins W, Jr., Santos CF, et al. An interleukin-1beta (IL-1beta) single-nucleotide polymorphism at position 3954 and red complex periodontopathogens independently and additively modulate the levels of IL-1beta in diseased periodontal tissues. *Infection and immunity*. 2008 Aug;76(8):3725-34.

Fox SW, Chambers TJ. Interferon-gamma directly inhibits TRANCE-induced osteoclastogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000 Oct 5;276(3):868-72.

Garlet GP, Avila-Campos MJ, Milanezi CM, Ferreira BR, Silva JS. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. *Microbes Infect*. 2005 Apr;7(4):738-47.

Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clin Exp Immunol*. 2007 Jan;147(1):128-38.

Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Garlet TP, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. The essential role of IFN-gamma in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2008 Apr;10(5):489-96.

Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral microbiology and immunology*. 2006 Feb;21(1):12-20.

Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of dental research*. 2010 Dec;89(12):1349-63.

Garred P, Madsen HO, Petersen J, Marquart H, Hansen TM, Freiesleben Sorensen S, et al. CC chemokine receptor 5 polymorphism in rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 1998 Aug;25(8):1462-5.

Genco CA, Van Dyke T, Amar S. Animal models for *Porphyromonas gingivalis*-mediated periodontal disease. *Trends in microbiology*. 1998 Nov;6(11):444-9.

Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *Journal of periodontology*. 2003 Mar;74(3):391-401.

Hamerman JA, Ni M, Killebrew JR, Chu CL, Lowell CA. The expanding roles of ITAM adapters FcRgamma and DAP12 in myeloid cells. *Immunological reviews*. 2009 Nov;232(1):42-58.

Han X, Kawai T, Taubman MA. Interference with immune-cell-mediated bone resorption in periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2007;45:76-94.

Henderson B, Wilson M, Sharp L, Ward JM. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of medical microbiology*. 2002 Dec;51(12):1013-20.

Herman S, Muller RB, Kronke G, Zwerina J, Redlich K, Hueber AJ, et al. Induction of osteoclast-associated receptor, a key osteoclast costimulation molecule, in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2008 Oct;58(10):3041-50.

Hida S, Yamasaki S, Sakamoto Y, Takamoto M, Obata K, Takai T, et al. Fc receptor gamma-chain, a constitutive component of the IL-3 receptor, is required for IL-3-induced IL-4 production in basophils. *Nat Immunol*. 2009 Feb;10(2):214-22.

Humphrey MB, Daws MR, Spusta SC, Niemi EC, Torchia JA, Lanier LL, et al. TREM2, a DAP12-associated receptor, regulates osteoclast differentiation and function. *J Bone Miner Res*. 2006 Feb;21(2):237-45.

Jimi E, Ghosh S. Role of nuclear factor-kappaB in the immune system and bone. *Immunological reviews*. 2005 Dec;208:80-7.

Johnson RB, Wood N, Serio FG. Interleukin-11 and IL-17 and the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of periodontology*. 2004 Jan;75(1):37-43.

Jotwani R, Muthukuru M, Cutler CW. Increase in HIV receptors/co-receptors/alpha-defensins in inflamed human gingiva. *Journal of dental research*. 2004 May;83(5):371-7.

Kaifu T, Nakahara J, Inui M, Mishima K, Momiyama T, Kaji M, et al. Osteopetrosis and thalamic hypomyelinoses with synaptic degeneration in DAP12-deficient mice. *The Journal of clinical investigation*. 2003 Feb;111(3):323-32.

Kim GS, Koh JM, Chang JS, Park BL, Kim LH, Park EK, et al. Association of the OSCAR promoter polymorphism with BMD in postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2005 Aug;20(8):1342-8.

Kim JH, Kim K, Jin HM, Youn BU, Song I, Choi HS, et al. Upstream stimulatory factors regulate OSCAR gene expression in RANKL-mediated osteoclast differentiation. *Journal of molecular biology*. 2008 Nov 14;383(3):502-11.

Kim Y, Sato K, Asagiri M, Morita I, Soma K, Takayanagi H. Contribution of nuclear factor of activated T cells c1 to the transcriptional control of immunoreceptor osteoclast-associated receptor but not triggering receptor expressed by myeloid cells-2 during osteoclastogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2005 Sep 23;280(38):32905-13.

Kobayashi R, Kono T, Bolerjack BA, Fukuyama Y, Gilbert RS, Fujihashi K, et al. Induction of IL-10-producing CD4+ T-cells in chronic periodontitis. *Journal of dental research*. 2011 May;90(5):653-8.

Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, et al. Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature*. 2004 Apr 15;428(6984):758-63.

Kondo T, Takahashi K, Kohara N, Takahashi Y, Hayashi S, Takahashi H, et al. Heterogeneity of presenile dementia with bone cysts (Nasu-Hakola disease): three genetic forms. *Neurology*. 2002 Oct 8;59(7):1105-7.

Kramer JM, Gaffen SL. Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. *Journal of periodontology*. 2007 Jun;78(6):1083-93.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998 Apr 17;93(2):165-76.

Loesche WJ. Bacterial mediators in periodontal disease. *Clin Infect Dis*. 1993 Jun;16 Suppl 4:S203-10.

Menezes R, Garlet TP, Trombone AP, Repeke CE, Letra A, Granjeiro JM, et al. The potential role of suppressors of cytokine signaling in the attenuation of inflammatory reaction and alveolar bone loss associated with apical periodontitis. *Journal of endodontics*. 2008 Dec;34(12):1480-4.

Mocsai A, Humphrey MB, Van Ziffle JA, Hu Y, Burghardt A, Spusta SC, et al. The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor gamma-chain (FcRgamma) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 Apr 20;101(16):6158-63.

Mogi M, Otogoto J. Expression of cathepsin-K in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *Archives of oral biology*. 2007 Sep;52(9):894-8.

Mohamed SG, Sugiyama E, Shinoda K, Taki H, Hounoki H, Abdel-Aziz HO, et al. Interleukin-10 inhibits RANKL-mediated expression of NFATc1 in part via suppression of c-Fos and c-Jun in RAW264.7 cells and mouse bone marrow cells. *Bone*. 2007 Oct;41(4):592-602.

Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *Journal of clinical periodontology*. 2002;29 Suppl 3:10-21; discussion 37-8.

Oates TW, Graves DT, Cochran DL. Clinical, radiographic and biochemical assessment of IL-1/TNF-alpha antagonist inhibition of bone loss in experimental periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2002 Feb;29(2):137-43.

O'Garra A, McEvoy LM, Zlotnik A. T-cell subsets: chemokine receptors guide the way. *Curr Biol*. 1998 Sep 10;8(18):R646-9.

Ormsby T, Schlecker E, Ferdin J, Tessarz AS, Angelisova P, Koprulu AD, et al. Btk is a positive regulator in the TREM-1/DAP12 signaling pathway. *Blood*. 2011 Jul 28;118(4):936-45.

Peng Q, Malhotra S, Torchia JA, Kerr WG, Coggeshall KM, Humphrey MB. TREM2- and DAP12-dependent activation of PI3K requires DAP10 and is inhibited by SHIP1. *Sci Signal*. 2010;3(122):ra38.

Pirracco RP, Reis RL, Marques AP. Effect of monocytes/macrophages on the early osteogenic differentiation of hBMSCs. *J Tissue Eng Regen Med*. 2012 Mar.

Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annual review of immunology*. 1997;15:707-47.

Rauner M, Sipos W, Pietschmann P. Osteoimmunology. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;143(1):31-48.

Repeke CE, Ferreira SB, Jr., Claudino M, Silveira EM, de Assis GF, Avila-Campos MJ, et al. Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and its receptors CCR1+ and CCR5+ in RANKL+ cell migration throughout experimental periodontitis in mice. *Bone*. 2010 Apr;46(4):1122-30.

Repeke CE, Ferreira SB, Jr., Vieira AE, Silveira EM, Avila-Campos MJ, da Silva JS, et al. Dose-response met-RANTES treatment of experimental periodontitis: a narrow edge between the disease severity attenuation and infection control. *PLoS One*. 2011;6(7):e22526.

Repeke CE, Trombone AP, Ferreira SB, Jr., Cardoso CR, Silveira EM, Martins W, Jr., et al. Strong and persistent microbial and inflammatory stimuli overcome the genetic predisposition to higher matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) expression: a mechanistic explanation for the lack of association of MMP1-1607 single-nucleotide polymorphism genotypes with MMP-1 expression in chronic periodontitis lesions. *Journal of clinical periodontology*. 2009 Sep;36(9):726-38.

Rossomando EF, Kennedy JE, Hadjimichael J. Tumour necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. *Archives of oral biology*. 1990;35(6):431-4.

Sato K. Th17 cells and rheumatoid arthritis--from the standpoint of osteoclast differentiation. *Allergol Int*. 2008 Jun;57(2):109-14.

Sato T, Abe E, Jin CH, Hong MH, Katagiri T, Kinoshita T, et al. The biological roles of the third component of complement in osteoclast formation. *Endocrinology*. 1993 Jul;133(1):397-404.

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology*. 2004 Feb;75(2):163-89.

Senis YA, Antrobus R, Severin S, Parguina AF, Rosa I, Zitzmann N, et al. Proteomic analysis of integrin α 5 β 3 outside-in signaling reveals Src-kinase-independent phosphorylation of Dok-1 and Dok-3 leading to SHIP-1 interactions. *J Thromb Haemost*. 2009 Oct;7(10):1718-26.

Silva TA, Garlet GP, Lara VS, Martins W, Jr., Silva JS, Cunha FQ. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *Oral microbiology and immunology*. 2005 Oct;20(5):310-6.

Sumpter TL, Packiam V, Turnquist HR, Castellaneta A, Yoshida O, Thomson AW. DAP12 promotes IRAK-M expression and IL-10 production by liver myeloid dendritic cells and restrains their T cell allostimulatory ability. *J Immunol*. 2011 Feb 15;186(4):1970-80.

Takahashi K, Azuma T, Motohira H, Kinane DF, Kitetsu S. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*. 2005 Apr;32(4):369-74.

Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *Journal of periodontal research*. 2005 Aug;40(4):287-93.

Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2005 Mar;83(3):170-9.

Takayanagi H. The role of NFAT in osteoclast formation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007 Nov;1116:227-37.

Tedla N, Gibson K, McNeil HP, Cosman D, Borges L, Arm JP. The co-expression of activating and inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors in rheumatoid synovium. *The American journal of pathology*. 2002 Feb;160(2):425-31.

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. *The Journal of clinical investigation*. 2000 Sep;106(6):R59-67.

Teng YT. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(4):237-52.

Tomasello E, Vivier E. KARAP/DAP12/TYROBP: three names and a multiplicity of biological functions. *Eur J Immunol*. 2005 Jun;35(6):1670-7.

Trombone AP, Cardoso CR, Repeke CE, Ferreira SB, Jr., Martins W, Jr., Campanelli AP, et al. Tumor necrosis factor-alpha -308G/A single nucleotide polymorphism and red-complex periodontopathogens are independently associated with increased levels of tumor necrosis factor-alpha in diseased periodontal tissues. *Journal of periodontal research*. 2009 Oct;44(5):598-608.

Trombone AP, Ferreira SB, Jr., Raimundo FM, Moura KCR, Avila-Campos MJ, Silva JS, et al. Experimental periodontitis in mice selected for maximal or minimal inflammatory reactions: increased inflammatory immune responsiveness drives increased alveolar bone loss without enhancing the control of periodontal infection. *Journal of periodontal research*. in press.

Webb A, Johnson A, Fortunato M, Platt A, Crabbe T, Christie MI, et al. Evidence for PI-3K-dependent migration of Th17-polarized cells in response to CCR2 and CCR6 agonists. *Journal of leukocyte biology*. 2008 Oct;84(4):1202-12.

Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 2005 Feb;115(2):282-90.

Wenink MH, Santegoets KC, Roelofs MF, Huijbens R, Koenen HJ, van Beek R, et al. The inhibitory Fc gamma IIb receptor dampens TLR4-mediated immune responses and is selectively up-regulated on dendritic cells from rheumatoid arthritis patients with quiescent disease. *J Immunol*. 2009 Oct 1;183(7):4509-20.

Whittaker GC, Orr SJ, Quigley L, Hughes L, Francischetti IM, Zhang W, et al. The linker for activation of B cells (LAB)/non-T cell activation linker (NTAL) regulates triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-2 signaling and macrophage inflammatory responses independently of the linker for activation of T cells. *The Journal of biological chemistry*. 2010 Jan 29;285(5):2976-85.

Wiebe CB, Adkins CA, Putnins EE, Hakkinen L, Larjava HS. Naturally occurring periodontal bone loss in the wild deer mouse, genus *Peromyscus*. *Journal of periodontology*. 2001 May;72(5):620-5.

Wong BR, Besser D, Kim N, Arron JR, Vologodskaia M, Hanafusa H, et al. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell*. 1999 Dec;4(6):1041-9.

Yu JJ, Ruddy MJ, Conti HR, Boonnanantanasarn K, Gaffen SL. The interleukin-17 receptor plays a gender-dependent role in host protection against *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontal bone loss. *Infection and immunity*. 2008 Sep;76(9):4206-13.

Yu JJ, Ruddy MJ, Wong GC, Sfintescu C, Baker PJ, Smith JB, et al. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood*. 2007 May 1;109(9):3794-802.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Sequências de *primers*, propriedades da reação e produto de amplificação

Alvos	Sequência <i>primer sense</i> Sequência <i>primer anti-sense</i>	<i>t</i> A (°C)	<i>t</i> M (°C)	bp
- Humanos -				
DAP-12	CCCGAATCATGACAGTCAGCA ATCGCGGTAGGAGTTGGAATG	60	82	87
TREM-2	CAGCCTGCATACTTGCCACTT TTGCCAGAGCAGAACAAGGAG	61	83	53
<i>SIRPb1</i>	CCTCGATGACTGCCCTTTACA CATGCATTTTGGAGGCAGAAC	57	78	53
FcRg	ACCTGTGGCTGCTTCAACCAT TGCAGCTTGACTGTCTGCAGA	60	81	65
OSCAR	TCAACGTGACCTTGAGATGCC GCGATCTCTCCAGGCTTGAAA	61	83	73
<i>PIR-A</i>	TGAAGCCTGAGGCAGAATCAA ATCAAAGCTGGCCCTGAACTC	60	82	72
β -actin	CCATCATGAAGTGTGACGTGG TCTGCATCCTGTCTGGCAAT	61	83	102
- Camundongos -				
DAP-12	AGTGCATATCTGGCCACCATG AGGAAGGAACAGAAGGCACCA	62	84	60
FcRg r3	ACGATGTTTTGGTGGCAGCA TCAAAGGAAGGCTGTGTGGCT	59	80	51
OSCAR	AACCTTTTCCTCAGCTCCACG TATCAGCGACAGGACCATGGT	52	82	56
<i>PILRA</i>	TGGAAAGCATGCAGTCCTTG TGCCAACTCCCCTGAAAACT	58	80	51
<i>SIRPb1</i>	TAGATGCCTGGACCCACATTC TCCCAGAAGCAGGATCAACAG	60	82	56
TREM-2	CGAGGAGTCATCGAGTTTCGA TCTTGATTCCTGGAGGTGCTG	60	82	60
RANKL	CAGAAGATGGCACTCACTGCA CACCATCGCTTTCTCTGCTCT	65	73	203
OPG	GGAACCCCAGAGCGAAATACA CCTGAAGAATGCCTCCTCACA	57	77	225
Cathepsin K	CTCCCTCTCGATCCTACAGTAATGA TCAGAGTCAATGCCTCCGTTTC	58	80	307
TNF- α	TGTGCTCAGAGCTTTCAACAA CTTGATGGTGGTGCATGAGA	58	80	124
IFN- γ	GCATCTTGGCTTTGCAGCT CCTTTTTCGCCTTGCTGTTG	28	77	121
IL-17	TCTTTAACTCCCTTGCGCA TGACGTGGAACGGTTGAGGTA	60	78	81
IL-10	TGGACAACATACTGCTAACC GGATCATTTCCGATAAGGCT	58	85	127
β -actin	ATGTTTGAGACCTTCAACA CACGTCAGACTTCATGATGG	56	75	495

*t*A: Temperatura de *annealing*; *t*M: Temperatura de *Melting*; bp: pares de base do produto de amplificação

APÊNDICE B – Variação da diferença entre moléculas co-estimulatórias e células inflamatórias dos camundongos wt/ko

** Indica a diferença entre a razão de moléculas co-estimulatórias (WT/KO - X/Y) e céls. inflamatórias (WT/KO - W/Z)
Valor apresentado nos gráficos a direita das Fig. 18 e 19.

		7 dias					30 dias			
		WT-AA	TNF α -KO	IFN- γ -KO	IL17-KO	IL10-KO	TNF α -KO	IFN- γ -KO	IL17-KO	IL10-KO
CELS INF	W/Z	1,84	1,84	2,125	0,758		2,31	2,118	1,307	0,29
TREM	X/Y	2,611	1,977	1,364	0,893		2,114	1,513	2,007	0,585
SIRP	X/Y	1,429	1,022	1,006	0,703		2,270	1,39	1,277	0,683
DAP	X/Y	2,821	1,924	1,508	0,928		2,458	1,5	2,229	0,535
FCR	X/Y	1,575	2,078	1,3	0,861		3,688	4,046	3,818	0,579
OSCAR	X/Y	3,413	1,399	1,272	0,8		2,223	1,73	3,029	0,861
PIR	X/Y	1,61	2,14	1,258	0,835		1,538	1,217	2,077	0,59
TREM	X/Y / W/Z	1,419022	1,074457	0,641882	1,1781		0,915152	0,714353	1,535578	2,017241
SIRP	X/Y / W/Z	0,77663	0,555435	0,473412	0,927441		0,982684	0,65628	0,977047	2,355172
DAP	X/Y / W/Z	1,533152	1,045652	0,709647	1,224274		1,064069	0,708215	1,705432	1,844828
FCR	X/Y / W/Z	0,855978	1,129348	0,611765	1,135884		1,596537	1,910293	2,921194	1,996552
OSCAR	X/Y / W/Z	1,854891	0,760326	0,598588	1,055409		0,962338	0,816808	2,317521	2,968966
PIR	X/Y / W/Z	0,875	1,163043	0,592	1,101583		0,665801	0,574599	1,589135	2,034483

Esquema da fórmula utilizada na confecção das Figuras 18 e 19 sobre a razão da diferença entre moléculas co-estimulatórias e células inflamatórias dos camundongos WT/KOs. Primeiramente foi dividido a média de expressão das moléculas co-estimulatórias de osteoclasto dos camundongos WT (X) pela média de expressão dos camundongos KOs (Y), gerando o número representado por X/Y. Igualmente foi dividido a média de células inflamatórias dos camundongos WT (W) pela média de céls. Inflamatórias dos camundongos KOs (Z), gerando o número representado por W/Z. Visando saber se houve uma diferença maior nas moléculas co-estimulatórias comparada com as células inflamatórias na ausência de determinada citocina (KOs), dividimos a razão entre a expressão de moléculas co-estimulatórias pela razão de células inflamatórias (X/Y / W/Z). A) Figura ilustrativa da operação realizada; B) Tabela com os números utilizados na operação.

ANEXO

ANEXO A – Ofício de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB/USP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
Fone: (14)3235-8355
e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 022/2008

Bauru, 7 de abril de 2009.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado *"Cinética de expressão de moléculas co-estimulatórias de osteoclastos no desenvolvimento da doença periodontal experimental e sua modulação por citocinas"*, de autoria de Carlos Eduardo Palanch Répeke foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator aprovando o projeto foi aceito *"ad referendum"* desta Comissão, considerando que não existem infrações éticas.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Antônio de Assis Taveira

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, em exercício

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Docente do Departamento de Ciências Biológicas