

Angélica Cristina Fonseca

RESUMO

Papel de STAT6 e MEK1/2 na polarização de macrófagos para um perfil M2 e seu impacto no reparo ósseo e reabsorção óssea inflamatória em camundongos

Uma adequada resposta imunológica é vital para um adequado reparo. Em lesões assépticas inicialmente pró-inflamatória será progressivamente substituída por um perfil anti-inflamatório resultando no reparo, contudo, quanto o agente agressor, lesões contaminadas, é de maior virulência ou ainda o próprio hospedeiro se encontra imunodeprimido este perfil pró-inflamatório se mantém determinando a cronificação da lesão. Dentre as células e citocinas que regulam o looping de eventos, temos os macrófagos, classificados em macrófagos M1 (pró-inflamatório) e M2 (anti-inflamatório). Muitos aspectos relacionados a polarização dos macrófagos ainda permanecem desconhecidas, e pensando especificamente na via de polarização M2 que é muito estudada em modelos tumorais havendo a necessidade de avaliação de novos modelos. Levando esta condição para o âmbito odontológico determinamos a comparação de dois eventos que representam o que foi elucidado acima, assim sendo, comparamos a reação inflamatória, principalmente a atuação dos M2 no reparo ósseo alveolar pós-exodontia e degradação óssea por lesão periapical. O tecido ósseo sofre ação direta dos eventos inflamatórios, assim, o conhecimento integral e a modulação da resposta imune poderia permitir uma adequada conduta clínica com ganho em volume e tempo de osso em quadros fisiológicos ou ainda patológicos. O objetivo deste trabalho consiste em avaliar o efeito gerado pelo bloqueio farmacológico das vias intracelular de STAT6 e MEK1/2 e seu efeito nos diferentes tipos de macrófagos, interferindo inicialmente e diretamente no processo de polarização M2 em modelos experimentais assépticos ou contaminados. Para o modelo de lesão periapical comparamos amostras humanas e murinas C57Bl/6-WT analisadas por diferentes técnicas (histologia, ELISA, RT-PCR e citometria de fluxo) em diferentes períodos. Amostras murinas ainda receberam tratamentos com inibidor de STAT6 e inoculação de CCL2p.

Para o modelo de reparo ósseo pós-exodontia utilizamos camundongos C57Bl/6-WT compondo grupo controle, grupo veículo, grupo MEK1/2i e grupo STAT6i analisados por microtomografia computadorizada (uCt), histológica (histomorfometria, birrefringência, imuno-histoquímica) e molecular. Grupos controles, tanto lesão periapical quanto reparo, no permitiram a confirmação da presença de macrófagos M2 (CD206, ARG, FIZZ, STAT6), que conduzem a uma lesão periapical inativa e uma resolução adequada do reparo ósseo pós-exodontia, contudo quando estas células são bloqueadas, inicialmente pelo uso de inibidor de STAT6, observamos que a diminuição de M2 levou a uma lesão periapical ativa e um reparo ósseo, com uma pequena desorganização em 7 dias, porém que conclui de forma satisfatória em 14 dias. Na sequência seguimos caminhos distintos para os modelos. Para o reparo inibimos a via MEK1/2 que também está relacionado a polarização de M2, está inibição afetou de forma mais notória a migração de M2 e o reparo ósseo se mostrou mais imaturo e atrasado. Para o modelo de lesão periapical inoculamos CCL2p que também levou a uma lesão inativa pela atuação de M2, contudo a ação combinada de CCL2p+STAT6i gerou uma inversão dos resultados. Concluímos assim que mesmo em um ambiente favorável para macrófagos com perfil M2, as vias de polarização como a via STAT6 e MEK1/2, são determinantes e primordiais para atuação dessas células, sendo que o modelo infeccioso nos permite resultados mais robustos e claros.

Palavras-chave: Fator de transcrição STAT6; Granuloma periapical; Macrófago; Osso e ossos; Sistema de sinalização das MAP Quinases

ABSTRACT

The role of STAT6 and MEK1/2 in the M2 macrophage polarization and its impact in bone repair and inflammatory bone resorption in mice

An adequate immune response is vital for proper repair. In initially pro-inflammatory aseptic lesions, it will be progressively replaced by an anti-inflammatory profile resulting in repair, however, when the aggressive agent, contaminated lesions, is of greater virulence or even the host itself is immunosuppressed, this pro-inflammatory profile remains determining. the chronicity of the lesion. Among the cells and cytokines that regulate event looping, we have macrophages, classified into M1 (pro-inflammatory) and M2 (anti-inflammatory) macrophages. Many aspects related to macrophage polarization remain unknown, and specifically thinking about the M2 polarization pathway that is widely studied in tumor models, there is a need to evaluate new models. Taking this condition to the dental field, we determined the comparison of two events that represent what was explained above, therefore, we compared the inflammatory reaction, mainly the role of M2 in post-extraction alveolar bone repair and bone degradation by periapical lesion. Bone tissue is directly affected by inflammatory events; thus, comprehensive knowledge and modulation of the immune response could allow an adequate clinical management with gain in bone volume and time in physiological or even pathological conditions. The aim of this work is to evaluate the effect generated by the pharmacological blockade of the intracellular pathways of STAT6 and MEK1/2 and its effect on different types of macrophages, interfering initially and directly in the M2 polarization process in aseptic or contaminated experimental models. For the periapical lesion model, we compared human and murine C57Bl/6-WT samples analyzed by different techniques (histology, ELISA, RT-PCR and flow cytometry) at different periods. Murine samples were further treated with STAT6 inhibitor and inoculated with CCL2p. For the post-extraction bone repair model, we used C57Bl/6-WT mice comprising a control group, transporter group, MEK1/2i group and STAT6i group analyzed by computed tomography (uCt), histological (histomorphometry, birefringence, immunohistochemistry) and molecular microscopy. Control groups, both periapical lesion and repair, did not allow confirmation of the

presence of M2 macrophages (CD206, ARG, FIZZ, STAT6), which lead to an inactive periapical lesion and an adequate resolution of post-extraction bone repair, however when these cells are blocked, initially by the use of a STAT6 inhibitor, we observed that the decrease in M2 led to an active periapical lesion and a bone repair, with a little disorganization in 7 days, but that concludes satisfactorily in 14 days. Next, we follow different paths for the models. For the repair, we inhibited the MEK1/2 pathway, which is also related to M2 polarization, this inhibition most notably affected M2 migration and bone repair was more immature and delayed. For the periapical lesion model, we inoculated CCL2p which also led to an inactive lesion by the action of M2, however the combined action of CCL2p+STAT6i generated an inversion of the results. We conclude that even in a favorable environment for macrophages with an M2 profile, polarization pathways such as the STAT6 and MEK1/2 pathways are crucial and essential for the performance of these cells, and the infectious model allows us to have more robust and clear results.

Keywords: STAT6 transcription factor; Periapical granuloma; Macrophage; Bone and bones; MAP kinase signaling system