

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Mariana Rates Gonzaga Santos

**PAPEL DE SOCS2 NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E PERDA ÓSSEA
ALVEOLAR DURANTE A INFECÇÃO PERIODONTAL EXPERIMENTAL
INDUZIDA POR *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

Belo Horizonte
2021

Mariana Rates Gonzaga Santos

**PAPEL DE SOCS2 NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E PERDA ÓSSEA
ALVEOLAR DURANTE A INFECÇÃO PERIODONTAL EXPERIMENTAL
INDUZIDA POR *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

Tese submetida ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica e Imunologia.

Orientadoras: Dra Fabiana Simão
Machado
Dra Mila Fernandes Moreira Madeira

Belo Horizonte
2021

043

Santos, Mariana Rates Gonzaga.

Papel de SOCS2 na modulação da resposta imune e perda óssea alveolar durante a infecção periodontal experimental induzida por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [manuscrito] / Mariana Rates Gonzaga Santos. – 2021. 102 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Fabiana Simão Machado. Orientadora: Dra. Mila Fernandes Moreira Madeira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Doenças Periodontais. 3. Proteínas Supressoras da Sinalização de Citocina. 4. Osteogênese. I. Machado, Fabiana Simão. II. Madeira, Mila Fernandes Moreira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE MARIANA RATES GONZAGA SANTOS. Aos seis dias do mês de agosto de 2021 às 13:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Papel de SOCS2 na modulação da resposta imune e perda óssea alveolar durante a infecção periodontal experimental induzida por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Fabiana Simão Machado, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Sandra Yasuyo Fukada Alves (Universidade de São Paulo), aprovada; Dr. Gustavo Pompermaier Garlet (Universidade de São Paulo), aprovada; Dra. Tarcília Aparecida da Silva (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Flávio Almeida Amaral (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Mila Fernandes Moreira Madeira - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Fabiana Simão Machado - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA

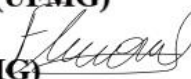
REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 06 de agosto de 2021.


Dra. Sandra Yasuyo Fukada Alves (Universidade de São Paulo)


Dr. Gustavo Pompermaier Garlet (Universidade de São Paulo)


Dra. Tarcília Aparecida da Silva (UFMG)


Dr. Flávio Almeida Amaral (UFMG)


Dra. Mila Fernandes Moreira Madeira - Orientadora (UFMG)


Dra. Fabiana Simão Machado - Orientadora (UFMG)

DEDICATÓRIA

Com enorme carinho,
Dedico este trabalho aos meus pais,
Jaime e Zelma

AGRADECIMENTOS

A **Deus** agradeço por tudo, principalmente por não ter me desamparado e por nunca me fazer desistir, mesmo nos momentos mais difíceis nessa caminhada.

Aos meus pais, **Zelma** e **Jaime**, meus exemplos de batalha, pelo amor, pela confiança e por me ensinarem a não desistir e por compreenderem a necessidade da minha ausência para a realização deste trabalho. É difícil lhes agradecer com palavras, pois não foi somente com elas que vocês me ensinaram a viver. Amo vocês!

Aos meus irmãos, **Maysa** e **Matheus**, obrigada pelo carinho e por compartilharem comigo esse e tantos outros momentos importantes na minha vida.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Fabiana Simão Machado**, agradeço acima de tudo por confiar e acreditar em meu potencial, pela paciência, e liberdade concedida. Minha eterna gratidão por todos os conhecimentos transmitidos, é fascinante o amor que você demonstra pela docência! Agradeço também pela amizade, por todo carinho e paciência com o qual sempre me recebeu, e pelo incentivo constante para perseguirmos os nossos sonhos. Você é uma pessoa iluminada, agradeço a oportunidade de ter convivido com você durante este tempo.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Mila Fernandes Moreira Madeira**, agradeço pela amizade e carinho, e pela paciência para me introduzir na rotina da pesquisa experimental. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos e por dividir comigo as expectativas deste trabalho. Gratidão pela disponibilidade, paciência e pela competência em todos os momentos. Foi um privilégio ter você como orientadora!

Aos meus eternos professores, **Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann**, e **Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira**, por acreditarem no meu potencial e incentivar à minha carreira acadêmica. Vocês foram fundamentais para esta conquista.

Ao **Allysson**, que, por tantas vezes caminhamos juntos, agradeço pelo carinho e gentileza. Sua amizade fez toda a diferença.

Ao **Celso**, pela amizade e conselhos. Agradeço também pelos conhecimentos trocados e pela disponibilidade em ajudar em qualquer situação.

À **Rayane e Laísa**, pela amizade e carinho, foi muito importante ter vocês por perto durante esses anos.

À **Jacque**, por toda alegria, bom-humor, competência e atenção com que sempre me recebeu e atendeu aos meus apelos, facilitando a realização deste trabalho.

Aos amigos, **Ian, Thales, Anna Clara, Paulo, Rafaela, César, Diego, Natália, Samuel, Simone, Katherinne, Wesley**, pelo convívio, amizade e incentivos. Foi muito bom conhecer vocês!

A todos os amigos do **LIMHO**, agradeço pelo convívio, amizade e oportunidade de troca de experiências.

Aos Professores do grupo **Imunofar**, em especial ao **Prof. Dr. Flávio Amaral, Profa. Danielle Souza, Prof. Dr. Caio Fagundes, Prof. Dr. Mauro Teixeira, Profa. Dra. Vanessa Pinho, Profa. Dra. Vivian Vasconcelos, Prof. Dr. Frederico** pela presteza diante das minhas solicitações, pelas contribuições, sugestões e conhecimentos transmitidos.

Aos **professores do Departamento de Bioquímica e Imunologia**, por dividirem ensinamentos e por toda atenção durante o curso de doutorado, contribuindo para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Às todas as agências de fomento **CAPES, CNPq e FAPEMIG**, que foram fundamentais no financiamento e para a realização de toda a pesquisa.

Ao **Departamento de Bioquímica e Imunologia, ao Instituto de Ciências Biológicas** e a **todos prestadores de serviços da UFMG**, sem os quais esse trabalho não seria possível.

A todos que, de alguma, forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!

RESUMO

Citocinas pró-inflamatórias desempenham um papel importante na destruição do tecido periodontal. Tem sido demonstrado que as proteínas SOCS são reguladores negativos da sinalização de citocinas em vários tecidos e podem desempenhar um papel na contenção da inflamação periodontal. Entretanto, o papel de SOCS2 durante o processo de osteoclastogênese é ainda desconhecido. Objetivo: Determinar o papel da SOCS2 na modulação das respostas do hospedeiro durante a doença periodontal experimental induzida por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). Métodos: A perda óssea alveolar foi induzida em camundongos knockout para SOCS2 (*Socs2*^{-/-}) de 8 semanas e tipo selvagem (WT) por inoculação oral de 100 µL de Aa (10⁹ UFC/mL) com 1,5% de carboximetilcelulose, a cada 48 h durante 7 dias. Os animais controle receberam apenas PBS. Após 30 e 60 dias de infecção, camundongos *Socs2*^{-/-} apresentaram aumento da perda óssea alveolar quando comparados a camundongos WT infectados. No entanto, os camundongos *Socs2*^{-/-} apresentaram níveis reduzidos de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF, e mostraram um aumento nos níveis do mediador antiinflamatório e pró-resolutivo, Lipoxina A4. Os camundongos *Socs2*^{-/-} também demonstraram um maior influxo de neutrófilos, no entanto, não houve alterações na expressão de RANKL na membrana de neutrófilos WT e *Socs2*^{-/-} após a estimulação com LPS-Aa ou Aa. Além disso, os neutrófilos deficientes em *Socs2*^{-/-} produziram níveis mais elevados de TNF após o estímulo com LPS-Aa e Aa em comparação com as células WT. Além disso, os resultados mostraram uma maior quantidade de células TRAP positivas em camundongos *Socs2*^{-/-}, e que permaneceu estável durante a infecção, ao contrário do observado em animais WT, onde há um aumento de células positivas para TRAP durante a infecção. Além disso, nenhuma diferença na quantidade de RANKL solúvel foi observada após a infecção em camundongos *Socs2*^{-/-} quando comparados com WT. Estudos *in vitro* demonstraram que as células da medula óssea de camundongos *Socs2*^{-/-} apresentaram maior diferenciação em osteoclastos do que células de camundongos WT. A deficiência de SOCS2 promoveu também menor resposta inflamatória induzida por LPS-Aa com menor secreção de TNF e IL-6 pelos osteoclastos, e menor resposta inflamatória induzida por Aa com menor secreção de TNF, IL-6, IL-1β e RANKL pelos fibroblastos, em comparação com células derivadas de camundongos WT. Osteoclastos derivados de camundongos *Socs2*^{-/-} exibiram expressão de mRNA semelhante de Traf6, Catepsina K, Rank, Ahr e Myd88 observada em células WT. No entanto, camundongos *Socs2*^{-/-} mostraram um aumento da expressão de mRNA de Tlr4 48 h após o estímulo RANKL + LPS-Aa. A análise de WB de osteoclastos de camundongos *Socs2*^{-/-} demonstra níveis basais/constitutivo aumentados de TRAF6, c-FOS e NFATc1 que foram diminuídos após estimulação com RANKL e LPS-Aa. Assim, nossos resultados sugeriram que SOCS2 pode desempenhar um papel importante no controle da perda óssea alveolar na doença periodontal experimental induzida por Aa, e esse mecanismo não parece estar relacionado ao controle da inflamação, mas parece ter um papel direto na sinalização de LPS-Aa e no processo de osteoclastogênese.

Palavras-chave: Doença periodontal, SOCS2, osteoclastogênese.

ABSTRACT

Periodontal disease is an inflammatory disease that leads to loss of dental support structures. Proinflammatory cytokines play a critical role in the destruction of periodontal tissue. SOCS proteins have been shown to be key negative regulators of cytokine signaling in several tissues and may play a role in restraining periodontal inflammation. The induction of SOCS2 may represent a general pathway responsible for controlling several innate/adaptative responses. However, the role of SOCS2 in osteoclastogenesis is still unclear. This study aimed to determine the role of SOCS2 in modulating host responses during experimental periodontal disease induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). Alveolar bone loss was induced in 8-wk-old SOCS-2-knockout (*Socs2*^{-/-}) and wild-type (WT) mice by oral inoculation with 100 μL of an inoculum containing 10⁹ CFU/mL of Aa with 1.5% of carboxymethylcellulose, each 48 h for 7 days. Control mice receive only PBS. Mice were euthanized 30 days after the last oral inoculation. *Socs2*^{-/-} mice intrinsically exhibited irregular phenotype in maxillary bone. After 30 and 60 days of infection, *Socs2*^{-/-} mice presented increased alveolar bone loss when compared to infected WT mice. However, *Socs2*^{-/-} mice had lower levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF and showed an increase in levels of anti-inflammatory and pro-resolving mediator, Lipoxin A4. *Socs2*^{-/-} mice also demonstrated a higher neutrophil influx, however there were no changes in RANKL expression on WT and *Socs2*^{-/-} neutrophils membrane after LPS-Aa or Aa stimulation. Of note, *Socs2*^{-/-} deficient neutrophils produced higher levels of TNF after LPS-Aa and Aa stimulus when compared to WT cells. Furthermore, the results showed a higher baseline amount of positive TRAP-positive cells in *Socs2*^{-/-} mice, and that it remains stable during infection, unlike that observed in WT animals, where there is an increase in TRAP-positive cells during infection. Moreover, no differences in the amount of RANKL was observed after infection in *Socs2*^{-/-} mice when compared to WT. In vitro studies have shown that bone marrow cells (BMC) from *Socs2*^{-/-} mice presented higher differentiation in osteoclast than WT BMC. Of note, SOCS2 deficiency promoted lower Aa lipopolysaccharide-induced inflammatory response with lower secretion TNF and IL-6 by osteoclasts, and lower Aa-induced inflammatory response with lower secretion of TNF, IL-6, IL-1β and RANKL by fibroblasts, as compared with WT. BMCs-derived osteoclasts from *Socs2*^{-/-} mice exhibited similar mRNA expression of *Traf6*, *Cathepsin K*, *Rank*, *Ahr*, and *Myd88* observed in WT cells. However, *Socs2*^{-/-} mice showed increased mRNA expression of *Tlr4* 48 h after RANKL+LPS-Aa stimulus. WB analysis of osteoclasts from *Socs2*^{-/-} mice demonstrates increased baseline levels of TRAF6, c-FOS and NFATc1 that were decreased after stimulation with RANKL and LPS-Aa. Thus, our results suggested that SOCS2 may play an important role controlling alveolar bone loss in experimental periodontal disease induced by Aa, and this mechanism does not seem to be related to the control of inflammation, but it seems to play a direct role in the LPS-Aa signaling and osteoclastogenesis process.

Key-words: Periodontal disease, SOCS2, osteoclastogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Sinalização via RANK na diferenciação de osteoclastos.....	27
Figura 2.	Cinética de expressão de mRNA para SOCS nos tecidos periodontais de camundongos infectados com <i>A. actinomycetemcomitans</i>	53
Figura 3.	Perda óssea alveolar de animais WT e <i>Socs2</i> ^{-/-}	54
Figura 4.	Fotos representativas da perda óssea alveolar na maxila de camundongos WT e <i>Socs2</i> ^{-/-} infectados com <i>A. actinomycetemcomitans</i>	54
Figura 5.	Fotos representativas obtidas por MicroCT da região óssea alveolar da maxila entre as raízes dos primeiros molares superiores.....	55
Figura 6.	Parâmetros ósseos obtidos por MicroCT da região óssea alveolar entre as raízes dos primeiros molares superiores 30 dias após a infecção com <i>A. actinomycetemcomitans</i>	56
Figura 7.	Parâmetros ósseos obtidos por MicroCT da região óssea alveolar entre as raízes dos primeiros molares 60 dias após a infecção com <i>A. actinomycetemcomitans</i>	57
Figura 8.	Quantificação de citocinas pro-inflamatórias em camundongos WT e <i>Socs2</i> ^{-/-} após infecção com <i>A. actinomycetemcomitans</i>	59
Figura 9.	Quantificação de citocinas anti-inflamatórias em camundongos WT e <i>Socs2</i> ^{-/-} após infecção com <i>A. actinomycetemcomitans</i>	60
Figura 10.	Quantificação das citocinas em camundongos WT e <i>Socs2</i> ^{-/-}	61
Figura 11.	A ausência de SOCS2 em fibroblastos diminuiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias <i>in vitro</i>	62
Figura 12.	Quantificação de mieloperoxidase (MPO) nos tecidos periodontais de camundongos WT e <i>Socs2</i> ^{-/-}	63
Figura 13.	Caracterização da pureza e viabilidade da cultura de neutrófilos	64
Figura 14.	Expressão de RANKL de membrana por neutrófilos.....	65
Figura 15.	Determinação da produção de TNF por neutrófilos após estímulo com AaLPS ou Aa.....	66
Figura 16.	Determinação da produção de RANKL em tecidos periodontais e por fibroblastos gengivais após estímulo com Aa.....	67

Figura 17.	Quantificação e fotos representativas das células marcadas com TRAP 30 ou 60 dias após a infecção.....	69
Figura 18.	Determinação da expressão de <i>Socs2</i> em osteoclastos.....	70
Figura 19.	Quantificação do número de osteoclastos <i>in vitro</i>	71
Figura 20.	Fotos representativas da cultura de osteoclastos.....	72
Figura 21.	Determinação da expressão de TNF e IL-6 por osteoclastos.....	73
Figura 22.	Determinação da expressão gênica de <i>Socs1</i> e <i>Socs3</i> em osteoclastos.....	74
Figura 23.	Determinação da expressão de <i>Tlr4</i> e <i>Myd88</i> em osteoclastos...	75
Figura 24.	Determinação da expressão de <i>Traf6</i> , <i>Rank</i> , <i>Ck</i> e <i>Ahr</i> em osteoclastos.....	76
Figura 25.	Expressão e determinação da expressão proteica de TRAF6, CASPASE3, c-FOS, NFATc1 e β -ACTINA em osteoclastos.....	77
Figura 26.	Aspecto macroscópico e valores de absorbância após diluição dos grânulos corados com vermelho de alizarina a 2% de culturas de células osteoblásticas provenientes de animais WT e <i>Socs2</i> ^{-/-}	79

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Pg	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
PMNs	Polimorfonucleares
TDC	Toxina de distensão citoletal
RANKL	Ligante do fator ativador de NF-kappa B
MMP	Metaloproteinases da matriz
TLR	Receptores semelhante a Toll
NFκB	Fator nuclear-kappa B
AP-1	Proteína ativadora 1
p38	Proteína cinase ativada por mitógeno p38
MPO	Mieloperoxidase
ROS	Espécies reativas de oxigênio
NO	Óxido nítrico
TRAF6	Fator ativador do receptor de TNF
PAF	Fator ativador de plaquetas
LXs	Lipoxinas
15-LO	15-lipoxigenase
15-HETE	Ácido 15-hidroxi-eicosatetraenóico
5-LO	5-lipoxigenase
LXA ₄	Lipoxina A4
FPR2	Receptor 2 do peptídeo N-formil
GPRC	Receptores acoplados a proteína G
AhR	Receptor de hidrocarboneto de arila
PI3k	Fosfatidilinositol-3-cinase
NFATc1	Fator nuclear das células T ativadas citoplasmático 1
M-CSF	Fator de estimulação de colônias de macrófagos
OPG	Osteoprotegerina
MAMPs	Padrões moleculares associados a micro-organismos
SOCS	Supressores de sinalização de citocinas
EPO	Eritropoietina

GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
GH	Hormônio do crescimento
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
hg	Camundongo com alto índice de crescimento
DMO	Densidade mineral óssea
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
TSA	Agar Triptona de Soja
UFC	Unidades formadoras de colônia
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separação trabecular
BV	Volume ósseo
BS / BV	Relação superfície/volume ósseo
TV	Volume do tecido
BS/TV	Densidade da superfície óssea
BV / TV	volume do osso trabecular/volume tecidual
Tb.Th	Espessura trabecular
JCE	Junção cimento-esmalte
COA	Crista óssea alveolar
TRAP	Fosfatase ácida
BMC	Células da medula óssea
Dpi	Dias pós-infecção

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Doença periodontal	19
1.2	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	21
1.3	Resposta imune na doença periodontal.....	21
1.4	Osteoclastogênese.....	25
1.5	Supressores de sinalização de citocinas (SOCS) e doença periodontal.....	28
1.6	SOCS2 e Metabolismo ósseo	34
2	OBJETIVOS.....	37
2.1	Objetivo geral.....	39
2.2	Objetivos específicos.....	39
3	MÉTODOS.....	40
3.1	Camundongos.....	42
3.2	Modelo de doença periodontal induzida por <i>A.</i> <i>actinomycetemcomitans</i>	42
3.3	Avaliação da perda óssea alveolar	43
3.4	Fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP).....	44
3.5	Quantificação de mieloperoxidase.....	44
3.6	Quantificação de citocinas.....	45
3.7	Expressão gênica.....	45
3.8	<i>Western Blotting</i>.....	46
3.9	Experimentos <i>in vitro</i>	47
3.9.1	<i>Cultura de fibroblastos</i>.....	47
3.9.2	<i>Cultura de neutrófilos</i>.....	47
3.9.3	<i>Cultura de osteoclastos</i>.....	48
3.9.4	<i>Cultura de osteoblastos</i>.....	48
3.10	Análise estatística.....	49
4	RESULTADOS.....	50
4.1	Avaliação do modelo <i>in vivo</i>.....	52
4.1.1	<i>Cinética de expressão gênica de SOCS (1, 2 e 3) nos tecidos periodontais de camundongos infectados com <i>A.</i> <i>actinomycetemcomitans</i></i>	52
4.1.2	<i>A ausência de SOCS2 aumenta a perda óssea alveolar induzida</i>	53

	<i>pela infecção por A. actinomycetemcomitans em camundongos.....</i>	
4.1.3	<i>A ausência de SOCS2 resulta em parâmetros ósseos maxilares alterados.....</i>	55
4.1.4	<i>A ausência de SOCS2 está relacionada a níveis reduzidos de TNF e IL-6 nos tecidos periodontais após a infecção.....</i>	57
4.1.5	<i>Fibroblastos deficientes em SOCS2 produzem menores níveis de citocinas pro-inflamatórias após estímulo com Aa.....</i>	61
4.1.6	<i>A ausência de SOCS2 modifica o influxo de neutrófilos após a infecção sem interferir com a expressão de RANKL.....</i>	62
4.1.7	<i>A ausência de SOCS2 não modifica a produção de marcadores de reabsorção óssea nos tecidos periodontais de camundongos após a infecção com Aa.....</i>	67
4.1.8	<i>A ausência de SOCS2 modifica a quantidade de células TRAP positivas nos tecidos periodontais após a infecção com Aa.....</i>	68
4.2	Cultura de Osteoclastos.....	70
4.2.1	<i>Estímulo com AaLPS induz a expressão de SOCS2 em osteoclastos in vitro.....</i>	70
4.2.2	<i>SOCS2 é importante para a formação osteoclástica.....</i>	70
4.2.3	<i>SOCS2 modula a expressão de Socs1 e Socs3 em osteoclastos in vitro.....</i>	73
4.2.4	<i>SOCS2 modula sinalização de LPS-Aa em osteoclastos in vitro.....</i>	74
4.2.5	<i>SOCS2 modula vias de sinalização relacionadas com a osteoclastogênese.....</i>	75
4.2.6	<i>SOCS2 não interfere na atividade de osteoblastos in vitro.....</i>	78
5	DISCUSSÃO.....	80
6	CONCLUSÃO.....	90
	REFERÊNCIAS.....	94
		102
	ANEXO.....	

1

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença periodontal

A doença periodontal é uma doença inflamatória de etiologia infecciosa que leva à perda dos tecidos de suporte dentário, incluindo o osso alveolar e os tecidos conectivos. Inicialmente é restrita aos tecidos gengivais, mas com a persistência da inflamação pode afetar os tecidos de sustentação, culminando na perda do elemento dental (MARK BARTOLD; VAN DYKE, 2017). Além de ser uma das principais causas de perda dentária nas populações em todo mundo (DARVEAU, 2010), a periodontite pode afetar negativamente a saúde sistêmica, aumentando o risco de desenvolvimento de aterosclerose (GENCO; VAN DYKE, 2010; KEBSCHULL; DEMMER; PAPAPANOU, 2010), diabetes (LALLA; PAPAPANOU, 2011), artrite reumatoide (LUNDBERG et al., 2010) e partos prematuros (MADIANOS; BOBETSIS; OFFENBACHER, 2013), sendo, portanto, uma doença de relevância para a saúde pública.

Desse modo, a doença periodontal representa uma condição complexa, envolvendo interações entre o sistema imune do hospedeiro, a microbiota gengival e diversos fatores ambientais modificadores, como tabagismo e fatores genéticos (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). Estudos epidemiológicos, realizados na área de saúde bucal, apontam a doença periodontal como uma das doenças mais prevalentes na cavidade bucal (BROWN; LÖE, 1993). Nesse sentido, dados epidemiológicos, nos EUA, demonstram uma alta prevalência de periodontite, sendo que mais de 47% dos adultos apresentaram essa condição (EKE et al., 2012). No Brasil, a doença periodontal, na forma de gengivite ou periodontite, também é altamente prevalente na população. A Pesquisa Nacional de Saúde Bucal – SBBrasil 2010 mostrou que a prevalência da doença periodontal “moderada a grave” em adultos no Brasil foi de 15,3% (ANTUNES; RONCALLI; NARVAI, 2013).

Nas doenças periodontais, a estrutura da comunidade microbiana tem, ao longo dos anos, sido associada a espécies Gram-negativas, anaeróbicas e proteolíticas. Um número limitado de espécies foi considerado patógenos importantes, incluindo: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Recentemente, através da utilização de tecnologias mais modernas, a estrutura da comunidade microbiana

parece sofrer grandes alterações. Demonstrando que a disbiose em doenças periodontais é associada a um aumento na diversidade microbiana, que pode ser o resultado da função imunológica local prejudicada, maior disponibilidade de nutrientes ou um reflexo dos diversos nichos ambientais na bolsa periodontal (SANZ et al., 2017).

A disbiose é uma mudança na relação de equilíbrio entre o hospedeiro e a sua microbiota, que pode ser caracterizada, por exemplo, por alteração na quantidade relativa ou influência de espécies microbianas dentro de um ecossistema, em comparação com sua abundância na relação de equilíbrio, ou eubiose, sendo que os mecanismos que levam a essa condição são ainda pouco compreendidos (MAEKAWA et al., 2014). O que se observa é que alterações ecológicas no biofilme subgengival podem levar à inflamação nos tecidos gengivais. Em seguida, a inflamação impulsiona mudanças ambientais no sulco gengival, favorecendo o crescimento de espécies bacterianas proteolíticas Gram-negativas (MARK BARTOLD; VAN DYKE, 2017), como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) e *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) que possuem a capacidade de invadir os tecidos periodontais e estabelecer um quadro infeccioso.

Esta visão não exclui a possibilidade de casos de periodontite causada por um espectro mais restrito de organismos, conforme evidenciado pelo papel específico do clone JP2 de *Aa* em casos de periodontite agressiva em indivíduos de descendência da África Ocidental (HAUBEK et al., 2008).

Em geral, as características das comunidades microbianas nas doenças periodontais incluem a capacidade de resistir/desregular a resposta imune e inflamatória, para prevalecer em um ambiente anaeróbio e tirar proveito da disponibilidade nutricional alterada no fluido dos sulcos gengivais e sangue (SANZ et al., 2017). Assim, a destruição dos tecidos periodontais, devido a uma resposta inflamatória, favorece a disbiose, uma vez que fornece um exsudato inflamatório gengival rico em nutrientes, levando a mudanças de composição na comunidade microbiana do biofilme subgengival. Além disso, a reabsorção óssea alveolar inflamatória fornece à microbiota subgengival novos nichos para colonização (DARVEAU; HAJISHENGALLIS; CURTIS, 2012).

1.2 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A. actinomycetemcomitans é um cocobacilo Gram-negativo, não formador de esporos, imóvel e microaerófilo (HENDERSON et al., 2003). É considerado um dos principais periodontopatógenos, envolvido em determinados casos de doença periodontal, caracterizada por perda óssea alveolar rápida, grave e extensa (AMBROSIO et al., 2019).

A virulência de *Aa* está relacionada à marcante capacidade de invasão tecidual, presença de lipopolissacarídeo (LPS) e à produção de diversas proteases, adesinas e de uma potente leucotoxina, especialmente por clones altamente virulentos, como a cepa JP2 (D.H. et al., 2006). A leucotoxina de *Aa* é um dos seus principais fatores de patogenicidade que podem interferir com o sistema imunológico do hospedeiro, afetando leucócitos polimorfonucleares (PMNs) humanos, monócitos, macrófagos, linfócitos e hemácias (BAEHNI et al., 1979; BALASHOVA et al., 2006; KELK et al., 2011; MANGAN et al., 1991; TAICHMAN; DEAN; SANDERSON, 1980; WADE, 2011). Venketaraman et al. (2008) demonstraram que a leucotoxina pode proteger *Aa* da morte por macrófagos. Sendo que monócitos/macrófagos são altamente suscetíveis a essa leucotoxina, sendo lisados pela ativação de caspase 1 e secreção de interleucina-1 β (IL-1 β) (VENKETARAMAN et al., 2008).

Além disso, o LPS de *Aa* induz a produção de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF por células do hospedeiro (KELK et al., 2011). O LPS induz também a expressão do ligante do fator ativador de NF-kappa B (RANKL) em células osteoblásticas (ZOU; BAR-SHAVIT, 2002) e pode estimular diretamente a reabsorção óssea ou induzir a geração de osteoclastos *in vitro* (Lino, Hopps, 1984). Outro importante fator de virulência de *Aa* é a toxina de distensão citoletal (TDC) que está envolvida na manutenção da infecção pela modulação da resposta imune do hospedeiro. TDC pode alterar as funções macrofágicas, prevenindo a atividade fagocítica e modificando o equilíbrio de ação das citocinas, além de também induzir a apoptose em macrófagos (HENDERSON et al., 2003).

1.3 Resposta imune na doença periodontal

Embora a doença periodontal tenha uma etiologia infecciosa, acredita-se que a presença de bactérias que colonizam a superfície do dente e o sulco gengival seja

necessária, mas não suficiente para o início da doença periodontal. Nesse sentido, as respostas do hospedeiro desempenham um papel essencial na patogênese da doença periodontal, culminando na destruição dos tecidos conjuntivo e ósseo (GRAVES, 2008).

Apesar da resposta do hospedeiro ser destinada a controlar e/ou limitar a ação bacteriana associada à doença periodontal, as elevadas concentrações de citocinas inflamatórias podem resultar no aumento de metaloproteinases da matriz (MMP), na ativação dos osteoclastos e, conseqüentemente, na reabsorção óssea alveolar (GRAVES, 2008). De modo geral, as citocinas atuam tanto no início quanto na manutenção da resposta imune frente aos desafios bacterianos. Assim, alterações na produção de citocinas são associadas à exacerbação da resposta imune, o que pode resultar na destruição tecidual (GARLET, 2010).

A resposta inata do hospedeiro envolve inicialmente o reconhecimento de componentes microbianos pelas células hospedeiras e a subsequente produção de mediadores inflamatórios. Os receptores semelhante a Toll (TLRs) são expressos por células residentes e leucócitos no ambiente periodontal e ativam a resposta imune inata pela ligação a vários componentes bacterianos (LPS, DNA bacteriano, peptidoglicano etc.) (GRAVES, 2008). Após a ativação de TLRs, uma sinalização intracelular é estimulada, levando à ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear-kappa B (NF κ B), a proteína ativadora 1 (AP-1) e a proteína quinase ativada por mitógeno (p38); e à subsequente expressão de genes de produção de citocinas pro-inflamatórias, migração de leucócitos e osteoclastogênese (GARLET, 2010). Alguns estudos têm demonstrado o papel de TLR2 e TLR4 no reconhecimento de periodontopatógenos como *Aa* e *Pg* (KIKKERT et al., 2007; MADEIRA et al., 2013a).

A mucosa oral, a saliva, os neutrófilos transmigrantes e o fluido do sulco gengival formam as primeiras linhas de defesa contra o desafio microbiano advindo do biofilme dentário. Nesse sentido, as primeiras células a entrarem em contato com os micro-organismos são as células epiteliais que, ao interagirem com os micro-organismos invasores, produzem CXCL-8, uma quimiocina envolvida no recrutamento de leucócitos para o sítio de infecção (SILVA et al., 2007). De fato, os neutrófilos são as primeiras células a migrarem em direção ao foco inflamatório e constituem a maioria dos leucócitos recrutados, podendo ser encontrados no tecido conjuntivo gengival, no epitélio juncional e, especialmente, na bolsa periodontal (HAJISHENGALLIS; HAJISHENGALLIS, 2014).

Os neutrófilos podem causar destruição do tecido periodontal pela liberação de enzimas como mieloperoxidase (MPO) e MMP, ou substâncias citotóxicas, como as espécies reativas de oxigênio (ROS) (HAJISHENGALLIS; HAJISHENGALLIS, 2014). A MPO é armazenada em grânulos primários de neutrófilos e é liberada no fagossomo, participando no processo de destruição bacteriana. Um aumento na liberação de MPO pode gerar estímulos deletérios aos tecidos periodontais e, conseqüentemente, a perda da integridade das estruturas de suporte dos dentes, observadas em estágios mais avançados da doença periodontal (EL KEBIR et al., 2008). Já as EROs, em tecidos periodontais, têm a capacidade de matar os micro-organismos como *Aa* e *Pg* (GUENTSCHE et al., 2009).

Além disso, os neutrófilos podem induzir a reabsorção óssea alveolar pela expressão de RANKL ligado à membrana (CHAKRAVARTI et al., 2009). No entanto, como os neutrófilos não liberam RANKL solúvel (CHAKRAVARTI et al., 2009), eles podem mediar a reabsorção óssea periodontal somente se estiverem próximos ao osso. Adicionalmente, os neutrófilos são importantes no recrutamento e ativação de células apresentadoras de antígenos, gerando sinais que atraem monócitos/macrófagos para o sítio de infecção e atuam também no recrutamento quimiotático de células Th17 (PELLETIER et al., 2010).

Em seguida, à medida que a infecção progride, as células epiteliais, fibroblastos e células endoteliais produzem CCL2, uma quimiocina que induz a migração de macrófagos para o local da lesão (QUEIROZ-JUNIOR et al., 2011). Uma vez nos tecidos, o principal mediador antimicrobiano produzido pelos macrófagos é o óxido nítrico (NO). O NO é um radical livre que, quando produzido localmente e em altas concentrações, pode agir como uma molécula citotóxica em células infectadas com bactérias, podendo resultar em extensa destruição tecidual (YANAGITA et al., 2002).

Adicionalmente, os macrófagos apresentam um importante papel na eliminação de micro-organismos e na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF, que auxiliam na resposta imune (GRAVES, 2008). O TNF é uma citocina que, dentre outras ações, atua no processo de migração celular para os locais infectados e inflamados pela regulação das moléculas de adesão e produção de quimiocinas (GRAVES, 2008). Ele está presente em níveis elevados no fluido do sulco gengival e tecidos periodontais inflamados, onde está positivamente correlacionado à expressão de MMP e RANKL, desempenhando um papel central

na reação inflamatória e reabsorção óssea alveolar (GARLET et al., 2004). Além de apresentar um efeito direto sobre a patogênese da PD, o TNF regula a produção de outras citocinas pró-inflamatórias da imunidade inata, como a IL-1 β e IL-6, que estão também associadas à migração celular inflamatória e processos de osteoclastogênese (GRAVES, 2008). Além da ação direta na reabsorção óssea alveolar, IL-1 β e IL-6 também interferem no processo de formação óssea inibindo a diferenciação osteogênica (BEHL et al., 2008). Além da resposta imune inata, marcadores característicos dos subgrupos dos linfócitos T CD4+ Th1, Th2, Th17 e Treg foram descritos em tecidos periodontais inflamados (CARDOSO et al., 2008).

O IFN- γ é uma citocina característica de respostas do tipo Th1, sendo considerada a principal citocina ativadora de fagócitos, associada à produção de mediadores inflamatórios, como TNF, IL-1 β e, conseqüentemente, RANKL (MURPHY; REINER, 2002). Modelos experimentais de doença periodontal demonstraram que o IFN- γ está envolvido no desenvolvimento de reação inflamatória e reabsorção óssea alveolar em resposta a infecção por *Aa* ou *Pg* (GARLET et al., 2003). Contudo, tem sido descrito que o IFN- γ apresenta um papel controverso em lesões osteolíticas, sendo que resultados *in vitro* demonstraram que o IFN- γ induz a degradação rápida do fator associado ao receptor de TNF 6 (TRAF6) pelo sistema ubiquitina proteossoma, resultando na inibição da sinalização de RANKL e seus subseqüentes eventos osteoclastogênicos (TAKAYANAGI, 2005). Por outro lado, o IFN- γ também estimula a formação de osteoclastos e perda óssea *in vivo* pela ativação de células T direcionadas por antígeno, pela quimioatração de células RANKL positivas (GRAVES, 2008).

Outro fator que contribui consideravelmente para a destruição dos tecidos periodontais é a produção de mediadores lipídicos (MADEIRA et al., 2013b). Os mediadores lipídicos são sintetizados a partir do ácido araquidônico (AA) derivado da membrana celular dos leucócitos e outras células (FUNK, 2001). Eles funcionam como moléculas sinalizadoras, sendo que alguns apresentam atividades pró-inflamatórias, como as prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de plaquetas (PAF). As lipoxinas (LXs), por sua vez, apresentam atividades anti-inflamatórias e pró-resolutivas (CHANDRASEKHARAN; SHARMA-WALI, 2015).

As LXs são sintetizadas pelas ações sequenciais das enzimas lipoxigenases, dentre outras. Na mucosa bucal, as LXs são geradas a partir da oxigenação inicial

do AA pela enzima 15-lipoxigenase (15-LO), em células epiteliais da mucosa. Em seguida o intermediário formado (15-HETE) é alvo da ação da enzima 5-LO por neutrófilos, um processo definido como síntese transcelular, que resulta na produção de lipoxina A4 (LXA₄). A LXA₄ pode ligar-se ao receptor 2 do peptídeo N-formil (FPR2), do grupo dos receptores acoplados a proteína G (GPCR), ou ao receptor de hidrocarboneto de arila (AhR). As LXs geradas reduzem a diapedese de neutrófilos e o recrutamento dessas células para os tecidos (SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008). Na doença periodontal, foi demonstrado que a presença de LXA₄ facilita a regeneração óssea em modelos animais de doença periodontal (VAN DYKEN, 2011). Em um estudo *in vitro*, a LXA₄ inibiu várias vias moleculares associadas à sinalização de RANK, envolvida na osteoclastogênese, incluindo proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), NF-κB, AP-1, fosfatidilinositol-3-cinase (P13K), c-Fos, fator nuclear das células T ativadas citoplasmático 1 (NFATc1) e ROS (LIU; LERNER; TENG, 2010).

1.4 Osteoclastogênese

A integridade do tecido ósseo depende da manutenção de um equilíbrio delicado entre os processos de reabsorção por osteoclastos e formação óssea por osteoblastos (NISHIDA et al., 2001). Este processo, chamado de remodelação óssea, é um pré-requisito para a homeostase esquelética normal ao longo da vida, sendo regulada por uma variedade de fatores, como citocinas, quimiocinas, hormônios e estímulos bioquímicos (LEIBBRANDT; PENNINGER, 2008). Os osteoclastos são células grandes e multinucleadas com a capacidade de degradar matrizes orgânicas e inorgânicas do tecido ósseo. São derivados de células precursoras hematopoiéticas da linhagem monócito/macrófago e, como tal, compartilham muitas das características das células imunológicas. Requerem fator de estimulação de colônias de macrófagos (M-CSF) e RANKL para sua sobrevivência, proliferação, diferenciação e ativação (XU; TEITELBAUM, 2013).

RANKL, uma proteína de membrana do tipo II, pertence à superfamília do TNF e contém domínios de ligação ao receptor C terminal e transmembrana. O principal mecanismo de regulação da atividade dos osteoclastos é impulsionado pela ligação de RANKL ao receptor RANK, presente nas superfícies dos pré-osteoclastos, impulsionando sua maturação e ativação, enquanto a osteoprotegerina (OPG) atua

como um receptor competitivo e inibe a ligação de RANK-RANKL (LEIBBRANDT; PENNINGER, 2008). Em relação à doença periodontal, estudos demonstraram um aumento da expressão de RANKL em tecidos periodontais doentes (GARLET et al., 2004).

Na ligação de RANKL a RANK há trimerização do receptor e ativação de uma via de sinalização. Ao contrário de outros membros da superfamília de TNF, cada interação de superfície entre RANK-RANKL é contínua. Porém, no domínio intracelular de RANK não há atividade enzimática intrínseca e sim a transdução de um sinal para o recrutamento de moléculas adaptadoras, como proteínas da família TRAF (DARNAY et al., 1998).

A família TRAF contém sete membros descritos até o momento (TRAF1 - 7), que medeiam principalmente os sinais induzidos por citocinas da família TNF e padrões moleculares associados a micro-organismos (MAMPs) (INOUE et al., 2000). A cauda citoplasmática de RANK contém três locais de ligação de TRAF6 e dois locais para a ligação de outros membros da família TRAF, incluindo TRAF2, TRAF3 e TRAF5. TRAF6 é a principal molécula adaptadora que associa RANK à osteoclastogênese. Camundongos *Traf6*^{-/-}, por exemplo, desenvolvem osteopetrose grave devido a problemas na atividade de reabsorção óssea (LOMAGA et al., 1999). Sinais mediados por TRAF6 são críticos para o desenvolvimento, homeostase e/ou ativação de células B, células T e células mieloides, incluindo macrófagos, células dendríticas e osteoclastos. TRAF6 é essencial para a ativação adequada da sinalização de IL-1 β e CD40, LPS, sinalização de citocinas e também para a manutenção do metabolismo ósseo (WALSH; LEE; CHOI, 2015).

Desse modo, o domínio citoplasmático de RANK liga-se a TRAF6, que transmite sinais para alvos *downstream*, levando à ativação de MAPKs e fatores de transcrição, como NF- κ B e AP-1 (DENG et al., 2000). RANK também ativa, parcialmente, o complexo de AP-1, por meio da indução de seu componente crítico, c-Fos. AP-1 é um complexo dimérico composto por Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2), Jun (c-Jun, JunB, JunD) e ATF (ATFa, ATF2, ATF3, ATF4, B-ATF). Ainda não está claro como c-Fos desempenha um papel tão exclusivo entre as proteínas AP-1 (WAGNER; EFERL, 2005).

Além disso, a ativação de NF- κ B induz a expressão do fator nuclear de células T citoplasmáticas ativadas 1 (NFATc1), que é o principal regulador da osteoclastogênese. Imediatamente após a estimulação por RANKL, NF- κ B é recrutado para o promotor NFATc1, que contém sites κ B. Em seguida, c-Fos é recrutado para o promotor NFATc1. Assim, NFATc1 é um gene alvo comum de ambos os fatores essenciais de transcrição NF- κ B e AP-1 durante a osteoclastogênese. Sabe-se que a indução de NFATc1 por RANKL é completamente anulada em células deficientes para c-Fos (TAKAYANAGI et al., 2002).

Em seguida, um sinal co-estimulador induz a oscilação de Ca^{2+} via fosfolipase $\text{C}\gamma 2$ ativada juntamente com c-Fos/AP-1, em que a sinalização de Ca^{2+} facilita uma produção robusta de NFATc1. Na fase final da osteoclastogênese, NFATc1 transloca-se para o núcleo, onde induz numerosos genes-alvo específicos de osteoclastos, que são responsáveis pela fusão e função celular como TRAP, receptor de calcitonina, catepsina K e genes de integrina b3 (PARK et al., 2017).

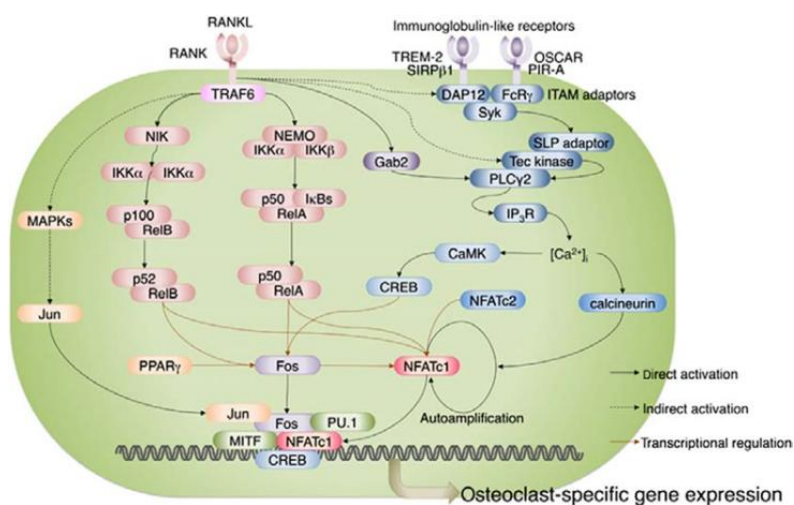


Figura 1. Sinalização via RANK na diferenciação de osteoclastos. A estimulação RANKL leva à ativação de várias vias de sinalização incluindo MAPK e as vias canônicas/não canônicas de NF- κ B, por meio de TRAF6; bem como uma via de Ca^{2+} por meio dos adaptadores ITAM, para receptores semelhantes a imunoglobulinas, como OSCAR, TREM-2, SIRPb1 e PIR-A. Vias NF- κ B contribuem para a indução de Fos e NFATc1, que são fatores de transcrição essenciais para diferenciação de osteoclastos. NFATc1 é ativado por um sinal de Ca^{2+} *downstream* de receptores semelhantes à Ig, pela fosforilação de tirosina de moléculas de sinalização, como Syk, Tec quinases, adaptadores SLP e PLCg2. Finalmente, NFATc1 ativa a transcrição de genes específicos de osteoclastos juntamente com AP-1, CREB, PU.1 e MITF. Extraído de Lorenzo et al., (2011).

A função preponderante de osteoclastos é degradar as matrizes orgânicas e inorgânicas de osso. O acúmulo de moléculas de degradação óssea na

superfície de reabsorção requer uma aproximação física entre os osteoclastos e o tecido ósseo, assim como a formação de um microambiente funcionalmente isolado do espaço extracelular (TAKAYANAGI, 2005). Assim, os osteoclastos realizam essa tarefa reestruturando seu citoesqueleto para formar uma zona de selamento que circunda o meio de reabsorção óssea. A célula secreta HCl via uma H⁺ATPase eletrogênica (bomba de prótons) e canal de Cl com carga acoplada, ClC-7, acidificando assim o microambiente reabsortivo. Em consequência, a matriz orgânica do osso é desmineralizada e subsequentemente degradada pela enzima lisossomal, catepsina K, finalizando o processo de reabsorção óssea (XU; TEITELBAUM, 2013).

1.5 Supressores de sinalização de citocinas (SOCS) e doença periodontal

Ao contrário da via destrutiva, que envolve principalmente citocinas e mediadores pró-inflamatórios, vias reguladoras mediadas por citocinas anti-inflamatórias, além de eicosanoides, podem controlar ou atenuar o desenvolvimento da DP. A citocina anti-inflamatória IL-10 é expressa em tecidos periodontais inflamados e está associada a uma menor gravidade da doença, apresentando um papel protetor da destruição tecidual (GARLET et al., 2004). Portanto, um equilíbrio dos níveis relativos de mediadores pró e anti-inflamatórios é essencial para controlar a extensão da destruição periodontal (GARLET et al., 2006).

O controle da sinalização celular pode ser exercido por supressores de sinalização de citocinas (SOCS) (GARLET et al., 2004), que atuam na diminuição da transdução de sinais, como parte de um circuito de *feedback* negativo para inibir a resposta a estímulos subsequentes. Os membros da família SOCS são reguladores endógenos da via JAK/STAT e podem ser induzidos em resposta a uma variedade de citocinas com atividades tanto pró quanto anti-inflamatórias (RAKESH; AGRAWAL, 2005). A família SOCS consiste em oito proteínas, nomeadas SOCS1 - SOCS7 e uma molécula chamada CIS. Cada uma destas proteínas tem um domínio SH2 central, um domínio amino-terminal de comprimento e sequência variáveis; e uma região carboxiterminal de 40 aminoácidos, denominada caixa SOCS (INAGAKI-OHARA; YOSHIMURA, 2014). As proteínas SOCSs podem interagir com uma série de intermediários de sinalização, atuando como ligases de ubiquitina para proteínas

associadas, direcionando-as para a degradação proteossomal (INAGAKI-OHARA; YOSHIMURA, 2014).

Todos os membros SOCS compartilham uma sequência de homologia. Entretanto, mas especificamente CIS/SOCS1/SOCS2, SOCS3/SOCS4/SOCS5 e SOCS6/SOCS7 têm homologia entre pares marcada de maneira inquestionável (YANAGITA et al., 2002). Os genes SOCS são expressos em algumas células em repouso, como células Th *naive* e macrófagos; e são rapidamente induzidos por citocinas por vias de sinalização JAK/STAT (YU et al., 2015). As proteínas SOCS bloqueiam a fosforilação de STATs ao inibir a atividade da quinase de JAKs, causando um bloqueio da ativação do STAT. Desta forma, a caixa SOCS interage com Elonginas (B e C) para recrutar E2 ubiquitina-transferase, necessária para a regulação negativa da sinalização de citocinas (KAMIZONO et al., 2001). A interação entre SOCS e o complexo Elongina BC e Culina 2, facilita a ubiquitinação de JAKs e seus receptores de citocinas, que os direciona para a degradação proteossomal (YIN; LIU; DAI, 2015). Assim, as proteínas SOCS usam uma gama de mecanismos para inibir a sinalização de citocinas via JAK/STAT: enquanto os domínios KIR e SH2 de SOCS1 podem ligar-se diretamente ao domínio JAK quinase para inibir a fosforilação (SAINT-GERMAIN et al., 2019). SOCS3 tem como alvo, complexos de receptores de citocinas, incluindo aqueles para citocinas da família IL-6 contendo o receptor de sinalização gp130, para inibir a sinalização de JAK-STAT. Além disso, evidências têm demonstrado o surgimento de proteínas adicionais que interagem com SOCS3 (Cavin-1 e CUEDC2) e que são também necessárias para uma completa inibição da sinalização de citocinas.

Os membros mais estudados da família SOCS, CIS, SOCS1, SOCS2 e SOCS3 são importantes na regulação da imunidade, inflamação e remodelação óssea. SOCS1, por exemplo, pode ser induzido por um subconjunto de citocinas, incluindo IL-2, IL-3, eritropoietina (EPO), Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF) e IFN- γ (Ilangumaran, Bobbala e Ramanathan, 2017). Além disso, RANKL pode induzir a expressão de SOCS1 e SOCS3 em células progenitoras de osteoclastos, revertendo os efeitos inibitórios do IFN tipo I na osteoclastogênese (HAYASHI et al., 2002a).

Estudos realizados em camundongos deficientes para as proteínas SOCS demonstraram a importância dessas proteínas em restringir a inflamação e aumentar

a resposta imune protetora em vários distúrbios inflamatórios, incluindo artrite, aterosclerose e câncer (WONG et al., 2006). Por outro lado, as funções de cada membro das proteínas SOCS são complexas, uma vez que essas proteínas podem ter regulação recíproca (TANNAHILL et al., 2005). A expressão de SOCS1, SOCS2 e SOCS3 é significativamente maior em lesões periodontais, quando comparado aos tecidos periodontais saudáveis (GARLET et al., 2006). Em um estudo, utilizando um modelo de DP experimental, foi demonstrado que as proteínas SOCS estão envolvidas no controle das vias de sinalização de LPS e citocinas na inflamação periodontal. Injeções de LPS de *Escherichia coli*, nos tecidos gengivais palatinos dos primeiros molares, induziram inflamação e um aumento da expressão de SOCS3, em paralelo com um aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF, assim como da fosforilação do STAT3 (CHAVES DE SOUZA et al., 2013). Já foi demonstrado também que SOCS3 regula negativamente mediadores pró-inflamatórios induzidos por LPS em osteoblastos, desempenhando assim um papel crítico na sinalização imune mediada por osteoblastos (YAN et al., 2010).

Em relação ao papel do SOCS1 durante o processo de remodelação óssea, camundongos deficientes para SOCS1 apresentam tamanho menor que seu tipo selvagem (LIAU et al., 2018). A ruptura da regulação da via JAK-STAT em camundongos deficientes de SOCS1 desencadeia anormalidades esqueléticas significativas, como: áreas subcalcificadas no crânio e esterno e áreas calcificadas menos espessas de osso cortical. A deficiência de SOCS1, em osteoblastos, levou à inibição da maturação terminal, resultando no acúmulo de osteoblastos imaturos e características semelhantes à osteopenia. Em resumo, na ausência de SOCS1, as anormalidades observadas são o resultado de uma deficiência na função de osteoblastos, mas não no excesso de reabsorção óssea por osteoclastos (ABE et al., 2006).

De forma similar, SOCS3 é induzido por diferentes citocinas, incluindo IL-6, IL-10, IFN- γ e RANKL. Curiosamente, SOCS3 atenua o processo inflamatório durante processos osteoclastogênicos. mRNA de SOCS3 é indetectável em macrófagos, mas osteoclastos expressam SOCS3, regulada positivamente por TGF- β . Na verdade, TGF- β induz rapidamente a expressão de SOCS3 em células precursoras de macrófagos/osteoclastos, representando um mecanismo de supressão da sinalização inibitória de citocinas por TGF- β , o que pode favorecer a

reabsorção óssea (FOX et al., 2003). O envolvimento de SOCS3 na diferenciação de osteoblastos foi detectado por meio da modificação de sinalização do hormônio do crescimento (GH) (MORALES et al., 2002). A expressão de SOCS3 já foi observada após um desafio com LPS em osteoblastos o que, aparentemente, contribuiu para a inibição da liberação de IL-6 por essas células (YAN et al., 2010). Recentemente, um mecanismo de comunicação celular necessário para a maturação do osso cortical foi identificada, através de um estudo que mostrou que houve um atraso na consolidação do osso cortical em camundongos *Dmp1Cre: Socs3f/f*, que não expressam *Socs3* em células que expressam *Dmp1Cre* (osteócitos e osteoblastos tardios) (CHO et al., 2017). Além disso, a deleção de *Socs3* na linhagem de células osteocondrais também atrasou a formação de osso cortical denso, causando redução no tamanho do osso e um desenvolvimento anormal do osso cortical em camundongos (LIU et al., 2014). Em contraste, a deleção de *gp130* em osteócitos resgata as características de atraso na corticalização em camundongos *Dmp1Cre: Socs3f/f* (WALKER et al., 2020). Demonstrando que a inibição da sinalização de citocinas por SOCS3 em osteócitos é necessário para a formação de osso cortical.

De acordo com esses achados, alguns dados demonstraram que as proteínas SOCS podem ter um papel potencial no controle da liberação de mediadores de reabsorção óssea, incluindo IL-1 β , IL-6 e RANKL, em condições inflamatórias (PAPATHANASIOU et al., 2016). Assim, os efeitos imunomoduladores das proteínas SOCS, que controlam a via JAK/STAT e várias outras vias de sinalização intracelular, em diferentes tipos de células, indicam-nas como atrativas candidatas a imunoterapias no controle de doenças ósseas inflamatórias.

Entre os membros da família SOCS, SOCS1 e SOCS3 são os inibidores mais potentes (RAKESH; AGRAWAL, 2005). Pouco é relatado sobre o papel de SOCS2 na patogênese da doença periodontal.

As proteínas SOCS geralmente estão ausentes ou são minimamente expressas em tecidos periodontais saudáveis, e sua regulação e expressão diferencial em tecidos inflamados é um mecanismo regulatório importante que pode influenciar o resultado da reação inflamatória. As proteínas SOCS podem atuar para atenuar múltiplas vias de sinalização no periodonto doente. De fato, pacientes com gengivite crônica e periodontite apresentam expressão de mRNA de SOCS1, 2 e 3 significativamente maior no tecido gengival quando comparados com controles

saudáveis (GARLET et al., 2006). Até o momento, os membros da família SOCS mais estudados no contexto da doença periodontal são a SOCS1 e 3. Os estudos com a SOCS2 são escassos, de forma que o entendimento da função dessa proteína na doença periodontal ainda merece mais investigações.

Evidências de tecido periodontal de pacientes com doença periodontal mostraram que os níveis de RNAm de SOCS1 e SOCS3 foram significativamente maiores em tecidos gengivais de pacientes com gengivite do que periodontite crônica. Houve correlações negativas entre os níveis de RNAm de SOCS1 e SOCS3 e os parâmetros clínicos da gravidade da doença (profundidade de sondagem e perda de inserção). No entanto, os níveis de TNF e IL-10 foram semelhantes entre os grupos gengivite e doença periodontal crônica. Esses dados sugerem que os níveis aumentados de RNAm de SOCS1 e 3 poderiam fornecer um controle mais eficaz da lesão induzida pela inflamação na gengivite do que na periodontite e, portanto, contribuir para a natureza não progressiva da gengivite (GARLET et al., 2006).

Em relação ao papel das proteínas SOCS durante o processo osteoclastogênico na doença periodontal, SOCS1 e SOCS3 foram correlacionados com a regulação da inflamação em tecidos periodontais de ratos com periodontite induzida por ligadura. Nesse contexto, a expressão da proteína SOCS foi associada a níveis aumentados de IL-6, TNF e RANKL nos tecidos periodontais doentes. A expressão da proteína SOCS teve aumento significativo já aos 7 dias, e diminuiu em períodos experimentais posteriores, concomitantemente à produção de citocinas. Conseqüentemente, a ativação de STAT1 e STAT3 seguiu a expressão de SOCS1 e SOCS3, respectivamente. Esse padrão diminuiu ao final do período experimental, de acordo com a redução da gravidade da inflamação. Assim, a expressão da proteína SOCS refletiu a intensidade da inflamação e a perda óssea durante a progressão da doença periodontal experimental (DE SOUZA et al., 2011). De acordo com essas evidências, a perda da função de SOCS3 resultou em aumento da perda óssea alveolar e número de osteoclastos, e aumento da expressão de RANKL após infecção por *Pg*. Este fenótipo foi associado ao aumento da resposta inflamatória com maior secreção de IL-1 β , IL-6 e CXCL1 por macrófagos infectados (PAPATHANASIOU et al., 2016). De fato, a expressão de *Socs3* foi regulada positivamente após injeções de LPS de *Escherichia coli* nos tecidos gengivais de

ratos. Tal aumento foi paralelo ao aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF e aumento da fosforilação de STAT3 (CHAVES DE SOUZA et al., 2013). Além disso, houve uma expressão de Socs3 significativamente maior associada à perda óssea na osteoclastogênese mediada por CD11c (+) DC. No entanto, não houve alteração detectável nos níveis de TRAF6 e adaptadores de sinalização de MAPKs (ou seja, Erk, Jnk, p38 e Akt) em células T RANKL (+), embora essas moléculas sejam importantes para a formação e ativação de osteocalstos (ZHANG et al., 2009).

SOCS, como mencionado antes, também medeia a inibição direta da sinalização de citocinas inflamatórias. Por meio de um mecanismo regulador de feedback negativo, o aumento da atividade de STAT leva ao aumento da expressão de SOCS em uma tentativa de diminuir a ativação da via JAK / STAT. Por sua vez, reduz as consequências da ativação prolongada do STAT, que se relaciona ao aumento da expressão de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF) e à destruição do tecido periodontal. Estudos anteriores demonstraram que as citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-6 induziram a expressão de SOCS3, mas não de SOCS2 por células do ligamento periodontal humano, enquanto SOCS3 inibiu a secreção de IL-8 e MCP-1 induzida por citocinas por essas células (FUKUSHIMA et al., 2010). De fato, foi relatado que SOCS3 é fortemente induzido por IL-1 β , IL-6 e IL-10, e seu papel principal parece ser a atenuação da sinalização de citocinas inflamatórias (ALEXANDER; HILTON, 2004). Também foi relatado que SOCS3 se liga diretamente aos receptores de citocinas e inibe a via de sinalização IL-6/gp130 em células B, que estão envolvidas na diferenciação de osteoclastos em estados patológicos e fisiológicos (BALTO; SASAKI; STASHENKO, 2001). Assim, estudos *in vitro* em cultura de esplenócitos de ratos estimulados com DNA de *Pg*, resultaram na regulação positiva de transcritos e proteínas de SOCS1 e SOCS5, acompanhada por regulação negativa de IL-10. Assim, as respostas reduzidas de anticorpos observadas em animais injetados com DNA de *Pg* foram associadas à inibição da expressão de IL-10 por SOCS1 e / ou SOCS5 (TAUBMAN et al., 2007). Juntas, as evidências clínicas e experimentais atuais sugerem que a perda da regulação de SOCS leva a um meio rico em citocinas inflamatórias, como RANKL, IL-6 e TNF, que podem interromper a homeostase óssea e levar à perda óssea nos tecidos periodontais. Esses efeitos de SOCS na regulação das vias de sinalização

associadas à osteoclastogênese sugerem que essas proteínas desempenham um importante papel de *feedback* negativo, suprimindo a progressão da doença periodontal.

1.6 SOCS2 e Metabolismo ósseo

Semelhante aos outros membros da família SOCS, SOCS2 pode ser induzido por um subconjunto de moléculas, incluindo hormônio do crescimento (GH), PRL, EPO, GM-CSF, G-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-15, CNTF, IFN- α , IFN- γ , fator inibidor de leucemia, insulina, eritropoietina e IL-10 (LETELLIER; HAAN, 2016). No entanto, camundongos com uma deleção do gene *Socs2* têm o crescimento corporal pós-natal aumentado, resultando no aumento do comprimento dos ossos longos e um aumento proporcional dos músculos esqueléticos e da maioria dos órgãos viscerais (METCALF et al., 2000). Esses camundongos apresentam características de sinalização desregulada de GH e fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I), como o acúmulo de colágeno na derme, afetando a produção de proteína urinária e aumento da produção local de IGF-I em vários órgãos, incluindo o coração, pulmões e baço (METCALF et al., 2000). Essas descobertas sugerem um efeito importante de SOCS2 na inibição da via de sinalização GH / IGF-I.

GH é um importante regulador do crescimento corporal pós-natal. Uma grande parte de seu efeito de promoção de crescimento é mediado pelo estímulo da expressão de IGF-I no fígado e em tecidos periféricos. Um camundongo com alto índice de crescimento (hg) exibe um incremento de 30 a 50% no crescimento, no período pós-natal, sem resultar em obesidade. Foi demonstrado que hg é um alelo de *Socs2* (*Socs2hg*) e que a falta de expressão de *Socs2* é responsável pelo fenótipo de alto crescimento (HORVAT; MEDRANO, 2001), evidenciando o papel do SOCS2 na regulação do crescimento.

Consequentemente, a deficiência de SOCS2 também resulta em redução trabecular e na redução da densidade mineral óssea (BMD) em ossos longos (LORENTZON et al., 2005). Assim, a capacidade de SOCS2 de inibir a transdução de sinal induzida por outras citocinas, como IL-6, LIF e prolactina pode ser

importante para o mecanismo resultante na BMD reduzida em camundongos deficientes para SOCS2 (LORENTZON et al., 2005).

SOCS2 também já foi descrito como mediador das propriedades anti-inflamatórias das LXs; LX4_A e induzida por aspirina *in vivo* (Machado et al., 2006). McBerry e colaboradores relataram que TRAF6 é degradado por LXA4 por meio de uma via dependente de SOCS2 (MCBERRY et al., 2012a). Além disso, níveis aumentados de expressão de SOCS2 foram obtidos em pacientes com doença periodontal, podendo estar envolvido na regulação negativa de citocinas inflamatórias, da sinalização de TLRs e, portanto, na atenuação da reação inflamatória e da gravidade da doença periodontal (GARLET et al., 2006).

Assim, há evidências relevantes indicando que o desenvolvimento e progressão das lesões ósseas dependem de proteínas SOCS e, conseqüentemente, dos mediadores influenciados por elas. Porém, os mecanismos pelos quais SOCS2 controla a sinalização de citocinas durante o processo de osteoclastogênese na doença periodontal ainda são pouco compreendidos. Portanto, o objetivo deste estudo é determinar o papel de SOCS2 na modulação das respostas do hospedeiro durante a doença periodontal experimental induzida por Aa, em camundongos, investigando uma possível participação de SOCS2 durante o desenvolvimento da patogênese. Assim, pode-se contribuir para a criação de terapias que possam beneficiar o curso de doenças inflamatórias ósseas nas quais essas proteínas desempenham um papel fundamental, como a doença periodontal.

2 **Objetivos**

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o papel de SOCS2 na modulação da resposta imune na patogênese da doença periodontal experimental induzida por *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*).

2.2 Objetivos específicos

- Investigar o papel de SOCS2 na progressão da lesão tecidual induzida por *Aa*.
- Avaliar o impacto da deficiência em SOCS2 no padrão de reabsorção óssea alveolar durante a infecção de camundongos por *Aa*;
- Avaliar a participação de SOCS2 no perfil de produção de mediadores pro- e anti-inflamatórios durante a infecção por *Aa*;
- Avaliar o papel de SOCS2 durante o processo de diferenciação de osteoclastos na infecção por *Aa*.

3

Métodos

3 MÉTODOS

3.1 Camundongos

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG e aprovado, sob o número 319/2017, em 13/11/2017 (ANEXO 1). Foram utilizados camundongos deficientes para SOCS2 (*Socs2^{-/-}*) provenientes do biotério do Laboratório de Imunofarmacologia da UFMG e camundongos selvagens C57BL6/j, provenientes do Biotério Central da UFMG. Os camundongos foram divididos em dois grupos: 1-controle e 2-infectado, sendo que cada grupo apresentava um N = 5. Os animais foram eutanasiados 15, 30, 45 ou 60 dias após a infecção (dpi).

3.2 Modelo de doença periodontal induzida por *A. actinomycetemcomitans*

O modelo murino de doença periodontal experimentalmente induzida foi baseado em protocolo anteriormente descrito (MADEIRA et al., 2012). Inicialmente, a amostra FDC Y4 de *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*) (ATCC 43718, sorotipo b) foi cultivada em meio TSA e mantida em microaerofilia, a 37°C, por um período de 48 horas. Após este período foram cultivadas em microaerofilia, em caldo TSB por 24 horas, centrifugadas (5000 rpm - 5 minutos, temperatura ambiente) e o sedimento suspenso em PBS para obtenção da suspensão com absorbância correspondente a 1×10^9 UFC/mL (Abs = 1,2, em 560 nm), como previamente verificado pela técnica de cultivo de microgota.

Os animais foram submetidos à inoculação oral com 100 µL de uma solução contendo 1×10^9 UFC/mL de *Aa* acrescida de 1,5% de carboximetilcelulose, diretamente na cavidade oral com auxílio de micropipeta. Animais do grupo controle (sham-infectados) receberam a inoculação oral de 100 µL de PBS contendo 1,5% de carboximetilcelulose. Após o período de 48 e 96 horas, o mesmo procedimento de inoculação oral foi repetido. No decorrer do protocolo experimental todos os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum*, sendo que apenas nos dias das inoculações a alimentação foi suprimida por 4 horas e água por 30 minutos. O ambiente oral dos animais usados neste experimento foi manipulado com aplicação

tópica de digluconato de clorexidina 0,12% acrescido de 2% de carboximetilcelulose 24 horas antes da primeira inoculação.

15, 30 ou 60 dias após a última infecção, a eutanásia dos animais foi realizada pela administração de sobredose de anestésico. Os tecidos da maxila e mandíbula foram removidos e armazenados em freezer -80°C para análises posteriores.

3.3 Avaliação da perda óssea alveolar

Para avaliação do nível ósseo alveolar, cinco animais de cada grupo, após o período experimental, foram eutanasiados e tiveram os processos alveolares, dentes e palato duro removidos e separados em hemimaxilas, pela ruptura da sutura palatina. As maxilas obtidas a partir de camundongos controle ou infectados foram escaneadas, usando Skyscan 1176 (Bruker-MicroCT, Kontich, Bélgica). A trajetória de varredura foi redonda e um filtro de 0,5 mm foi usado. Foi utilizado um tamanho de pixel de câmera de $12,45\ \mu\text{m}$ com relação XY da câmera de 0,9870, tensão de 50 kV e corrente de $500\ \mu\text{A}$. As imagens foram analisadas usando o *software* Dataviewer e CTAn (Bruker-MicroCT). O limiar para análise foi estabelecido em 33. Os maxilares foram examinados em zonas coronal e sagital fixas para análise da densidade óssea. A região de interesse foi padronizada como circular na região do osso alveolar entre as raízes dos primeiros molares. O fenótipo ósseo foi avaliado na maxila em todos os três planos. Os parâmetros avaliados foram superfície do tecido (TS), número de trabéculas (Tb.N), separação trabecular (Tb.Sp), volume ósseo (BV), superfície óssea (BS), volume do tecido (TV), relação superfície / volume ósseo (BS / BV), densidade da superfície óssea (BS / TV), volume ósseo percentual (BV / TV), superfície de intersecção (iS), fator de padrão ósseo trabecular (Tb.Pf) e espessura trabecular (Tb.Th).

Para quantificação da perda óssea alveolar, foram geradas imagens para análises de MicroCT. Em seguida as imagens foram analisadas utilizando-se o programa Image J (National Institutes of Health, USA), medindo-se a área compreendida entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA). Para cada animal, a perda óssea alveolar foi definida como a média da área total entre a JCE e a COA, avaliada na face palatina do primeiro e segundo molar de uma hemiarcada.

3.4 Fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP)

No período de 30 dpi, três animais de cada grupo (controle e experimental) foram eutanasiados e as maxilas removidas. As amostras foram fixadas em formalina 10% por 24 horas, lavadas com água destilada e desmineralizadas em EDTA (14%, pH 7,0) por duas semanas, com trocas a cada 48 horas. Em seguida, as peças foram desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina, com a face palatina dos dentes voltada para baixo. Cortes seriados (5,0 µm de espessura) foram submetidos e então corados para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) e contra corados com hematoxilina N°3 de Gill de acordo com instruções do fabricante.

3.5 Quantificação de mieloperoxidase

O acúmulo de neutrófilos no tecido inflamado foi analisado, de maneira indireta, pelo ensaio de atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO), como anteriormente descrito (MADEIRA et al., 2012). Os fragmentos de tecido periodontal foram removidos 15, 30 ou 60 dpi e congelados. Após o descongelamento, o tecido (1 g para 19 mL de tampão) foi homogeneizado em tampão pH 4,7 (0,1M NaCl, 0,02M NaPO₄, 0,015M NaEDTA), centrifugado à 10.000 rpm (1500 g) por 10 min, a 4°C, descartando-se o sobrenadante. O precipitado sofreu lise hipotônica (15 mL de solução 0,2% de NaCl durante 30 s, seguida pela adição de igual volume da solução contendo 1,6% de NaCl e 5% de glicose). Após centrifugação, o precipitado foi suspenso em tampão 0,05 M NaPO₄ (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) e homogeneizado. Alíquotas da suspensão sofreram três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e foram centrifugadas por 15 min a 10.000 rpm, coletando-se o sobrenadante para o ensaio enzimático. A atividade de MPO foi medida por mudanças da densidade óptica (DO) a 450 nm usando tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H₂O₂ (0,5 mM). Os resultados foram expressos em unidades relativas com base em uma curva padrão de números de neutrófilos *versus* a D.O. do sobrenadante do tecido com neutrófilos do peritônio de camundongos processados da mesma maneira.

3.6 Quantificação de citocinas

O ensaio imunoenzimático ELISA foi utilizado para quantificar os níveis de citocinas nos tecidos periodontais. Cinco animais de cada grupo, selecionados aleatoriamente, foram eutanasiados no período de 15, 30, 45 ou 60 dpi e as maxilas removidas, para dosagem de IL-1, TNF, IL-10, IL-6, CXCL-1, IL-17, IFN- γ , TGF- β , utilizando kits comerciais (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Foi utilizado o ensaio ELISA sanduíche para determinar a concentração desconhecida de cada antígeno nas amostras. A quantificação de citocinas nos tecidos periodontais foi realizada segundo protocolos de Madeira et al. (2013). Para a extração de proteínas, tecidos periodontais palatinos foram homogeneizados em PBS (0,4 mM NaCl, 10 mM NaPO₄) com inibidores de proteases (0,1 mM PMSF, 0,1 mM Benzethonium clorídrico, 10 mM EDTA e 0,01 mg/mL Aprotinina A, pH 7.4) e Tween 20 (0,05%), centrifugados a 10000 rpm (1500 g) por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante estocado a -20 °C. Os resultados foram expressos em picogramas de citocinas (\pm SEM) por 100 mg de tecido periodontal e a absorbância obtida em espectrofotômetro a 492 nm.

3.7 Expressão gênica

Realizou-se o PCR quantitativo (qPCR), para avaliar a expressão gênica de lyso-PAF acetiltransferase, *Ahr*, *Fpr2*, *5lo* e *Lta4* hidrolase. Foi utilizado o sistema SYBRGreen em aparelho StepOne RealTime PCR System (Applied Biosystems, Warrington, UK). Amostras de RNA total extraído de tecidos periodontais de camundongos infectados e não infectados foram utilizadas para obtenção do DNA complementar (cDNA) que foi posteriormente utilizado, juntamente com o reagente SYBRGreen Master Mix (Applied Biosystems), para amplificação dos genes alvos. Foram utilizados 10 μ L do reagente SYBRGreen Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), 5 μ L da solução de cDNA, 4 μ L de água mili-Q estéril, e 1 μ L da solução contendo cada iniciador. A reação compreendeu 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, empregada para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação e utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Os resultados foram analisados com base

no valor de Ct (*Cycle threshold* – ou ciclo limiar). As reações de qPCR foram otimizadas com relação às concentrações ideais de cada par de iniciadores e temperatura de anelamento, de modo a maximizar eficiência e a especificidade de amplificação. Os resultados representam os valores da média \pm SEM, da intensidade de detecção do gene alvo.

1- GAPDH *forward* ACGGCCGCATCTTCTTGTGCA; e *reverse*
CGGCCAAATCCGTTACACCGA.

2-AhR *forward* CGGAGCGCTGCTTCCTCCAC, e *reverse*
GCTGCCCTTTGGCATCACAACC.

3-SOCS1 *forward* GCATCCCTCTTAACCCGGTAC; e *reverse*
AATAAGGCGCCCCCACTTA.

4- SOCS2 *forward* CGCGTCTGGCGAAAGC; e *reverse*
TTCTGGAGCCTCTTTTAATTTCTCT.

5- SOCS3 *forward* TTTGCGCTTTGATTTGGTTTG; e *reverse*
TGGTTATTTCTTTGGCCAGCA.

6- RANK *forward* CAAACCTTGGACCAACTGCAG; e *reverse*
GCAGACCACATCTGATTCCGT.

7-TRAF6 *forward* ATATGAACTCCCCAACCCCCT e *reverse*
AAACCACGGCAGGAAACG

8-CK *forward* CTCCCTCTCGATCCTACAGTAATG e *reverse*
TCAGAGTCAATGCCTCCGTTG;

9-MyD88 *forward* AGAAAAGGTGTCGCCGCAT e *reverse*
GGCTGAGTCCAAACTTGGTC;

10-TLR4 *forward* CAGAGTTTCCTGCAATGGATCAAG e *reverse*
TGCTTATCTGAAGGTGTTGCACATA

3.8 Western Blotting

As proteínas celulares foram extraídas usando um *kit* de extração de proteínas (Beyotime, Haimen, China). As células foram lisadas com tampão de lise (KeyGen Biotech, Nanjing, China) e centrifugadas. Os sobrenadantes foram mantidos. Os extratos de proteínas totais foram separados por SDS-PAGE e transferidos para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad,

Hercules, CA, EUA). As membranas de PVDF foram bloqueadas com 5% de BSA por 1 h em temperatura ambiente e, em seguida, marcadas com os seguintes anticorpos primários: anti-TRAF6 (1: 500; Santa Cruz,); anti-NFATc1 (1: 500; Cell Signaling); anti- β -actina (1: 3000; Cell Signaling); anti-cFOS (1:500; Santa Cruz), anti-Caspase3(1:1000, Cell Signaling). Em seguida, anticorpos secundários IgG H&L anti-mouse e anti-rabbit (1: 3000; Cell Signaling) foram adicionados, seguido de visualização usando um *kit* de quimioluminescência (Millipore).

3.9 Experimentos *in vitro*

3.9.1 Cultura de fibroblastos

Tecidos gengivais normais foram obtidos de camundongos WT machos ou *Socs2*^{-/-}. As células foram mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina e 100 mg / mL de estreptomicina (Hyclone, Pequim, China). Após atingir a confluência, as células foram destacadas da superfície da cultura com 0,25% de tripsina e subcultivadas em DMEM contendo 10% de SFB e solução antibacteriana. O meio foi trocado a cada 48 h. Foram utilizados fibroblastos entre a quarta e sétima passagem. As células foram colocadas em placas de 24 poços e cultivadas no respectivo meio por 24 horas antes do estímulo. Cada poço contendo fibroblastos foi submetido a desafio bacteriano com *Aa* com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1: 100 (células: bactérias) e incubado a 37 ° C com 5% de CO₂ por 24 a 48 h. Poços de cultura sem desafio bacteriano foram usados como controle. Os sobrenadantes da cultura foram colhidos e armazenados a -80 ° C após 6, 12, 24 e 48 horas de desafio bacteriano para os ensaios de quantificação de proteínas.

3.9.2 Cultura de neutrófilos

Os neutrófilos foram avaliados *ex vivo* para padrões de expressão molecular extracelular. Células purificadas foram retiradas de camundongos WT ou *Socs2*^{-/-}, seguida pela fixação e coloração com combinações de anticorpos específicos: RANKL (PE) e Ly6G (Alexa 647), todos da BD Pharmingen (San Diego, CA, United States). Os dados foram adquiridos em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton, Dickinson and Company, EUA) e as células viáveis foram analisadas por

citometria de fluxo, utilizando-se o *software* FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

3.9.3 Cultura de osteoclastos

As células da medula óssea (BMC), obtidas a partir do fêmur e da tíbia dos camundongos WT ou *Socs2*^{-/-}, foram centrifugadas com uma solução de lise para degradar hemácias. Em seguida, as células foram suspensas em meio alpha mem (α MEM, *no nucleosides*, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) suplementado com 10% de SFB. As células foram colocadas em garrafa de cultura com volume final de 10 mL de meio acrescido de 60 μ L do fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF 10 ng/mL, R&D Systems, MN, EUA) por 3 dias.

Após esse período, as células foram lavadas em PBS 1%, ressuspensas e contadas em câmara de Neubauer. Após a contagem, foram plaqueadas na quantidade de 2×10^4 células por poço, em uma placa de 96 poços, contendo RANKL murino recombinante (30 ng/mL, R&D Systems, MN, EUA) e M-CSF murino recombinante e estimuladas com LPS de *Aa* (*Aa*LPS - 2.5 μ g/ml). As células foram mantidas em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C por 3 dias. Ao final do período experimental, o sobrenadante foi coletado para análises, as células foram fixadas em uma solução de citrato, acetona e formaldeído 37% e coradas para fosfatase ácida resistente ao tártaro (TRAP, Sigma-Aldrich,) por 40 minutos a 37°C. Após esse período, a placa foi mantida em temperatura ambiente *overnight*, quando então os poços foram fotografados. O número de células TRAP-positivas foi contado utilizando um microscópio óptico Axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). Os dados foram expressos pela quantidade de células/campo no na objetiva de 40X. Sendo que foram consideradas apenas as células com 3 ou mais núcleos.

3.9.4 Cultura de osteoblastos

As BMC obtidas do fêmur e da tíbia dos camundongos WT ou *Socs2*^{-/-} foram centrifugadas com uma solução de lise para degradar as hemácias. Após esse processo, as células foram suspensas em meio α MEM, *no nucleosides* (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) suplementado com 10% de SFB. As células

foram colocadas em garrafas de cultura para células aderentes com volume final de 10mL de meio por 3 dias.

Após esse período, as células foram lavadas em PBS 1%, ressuspensas em meio DEMEM e contadas em câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram plaqueadas na quantidade de 2×10^4 células por poço, em uma placa de 24 poços, com o meio osteogênico, composto de SFB a 10%, dexametasona (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), strepten (Thermo Fisher Scientific), L-glutamina (Thermo Fisher Scientific), ácido ascórbico (Thermo Fisher Scientific) e fosfato de potássio (Thermo Fisher Scientific) por 21 dias. O meio foi trocado a cada dois dias. As células foram mantidas em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C. Ao final do período experimental os nódulos de mineralização foram corados com vermelho de alizarina a 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 30 minutos. Os poços foram então lavados com PBS 1% e deixados secar em temperatura ambiente *overnight*. Para análise quantitativa, os nódulos foram dissolvidos com uma solução de ácido acético e metanol a 10% por 30 minutos, sob agitação. A absorbância foi avaliada em espectrofotômetro (Biotek, Winooski, VT EUA) usando comprimento de onda de 490 nm.

3.10 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância (One-way ANOVA), seguida do teste Bonferroni e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se $p < 0,05$. As análises estatísticas e os gráficos foram elaborados utilizando-se o *software* GraphPad Prism 6.0.

4 Resultados

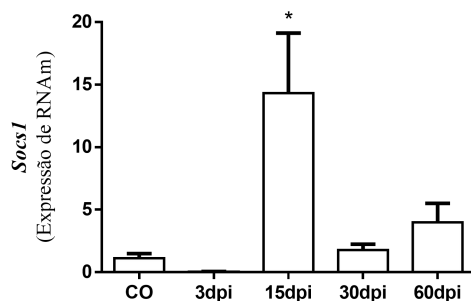
4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do modelo in vivo

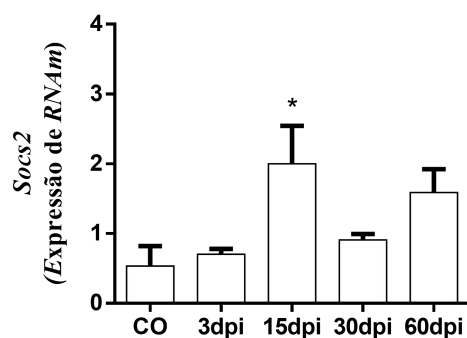
4.1.1 Cinética de expressão gênica de SOCS (1, 2 e 3) nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*

Conhecendo as características e funções das proteínas SOCS em doenças inflamatórias, o primeiro passo foi caracterizar a cinética de expressão de Socs 1, 2 e 3, durante o curso da doença periodontal experimental. Para isso, amostras de tecido periodontal de camundongos C57BL6 (WT) induzidos ao protocolo de doença periodontal por inoculação oral de *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*) foram analisados com relação à expressão de mRNA nos dias 3, 15, 30 e 60 após a infecção (dpi). Como pode ser observado na Figura 2, houve um aumento de expressão de mRNA estatisticamente significativo para *Socs1* (Fig.2A), *Socs2* (Fig. 2B), e um aumento, embora não estaticamente significativo de *Socs3* (Fig. 2C), 15 dias após a infecção.

A



B



C

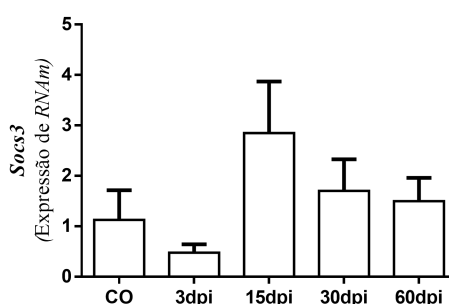


FIGURA 2. Cinética de expressão de mRNA para SOCS nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecidos periodontais de camundongos WT submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A. actinomycetemcomitans*, foram coletadas, o RNA total extraído e o nível de expressão de mRNA para *Socs1* (A), 2 (B) e 3 (C) foram analisados por PCR em tempo real (qPCR). Os valores são da intensidade de expressão para o gene alvo, normalizado pela expressão do gene endógeno *Gapdh*. A barra indica \pm desvio padrão da média. * $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle, avaliado por teste One Way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni.

4.1.2 A ausência de SOCS2 aumenta a perda óssea alveolar induzida pela infecção por *A. actinomycetemcomitans* em camundongos

A perda óssea alveolar foi avaliada pelo aumento da distância entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA), na face palatina do primeiro molar superior, caracterizando a perda óssea horizontal. Também verificamos lesões de furca nos primeiros e segundos molares e lesões proximais, que foi observada tanto nos animais WT quanto nos animais deficientes para a produção de SOCS2 (*Socs2*^{-/-}) (Fig. 3).

Com o auxílio do programa ImageJ, a área entre a JCE e a COA foi mensurada, na face vestibular dos primeiros molares superiores, nas hemiarcadas direitas, de animais WT e animais *Socs2*^{-/-} nos tempos de 30 ou 60 dpi. A perda óssea alveolar avaliada nos camundongos WT infectados, 30 ou 60 dpi, foi estatisticamente significativa em relação aos animais WT do grupo controle (Fig. 3). Comparativamente aos animais WT, os animais *Socs2*^{-/-} apresentaram perda óssea alveolar significativamente superior, 30 dpi, sendo progressiva até 60 dpi (Fig. 3). A figura 4 ilustra a perda óssea alveolar avaliada e comparativa em animais WT (Fig. 4A, B e C) e *Socs2*^{-/-} (Fig. 4 E, F e G).

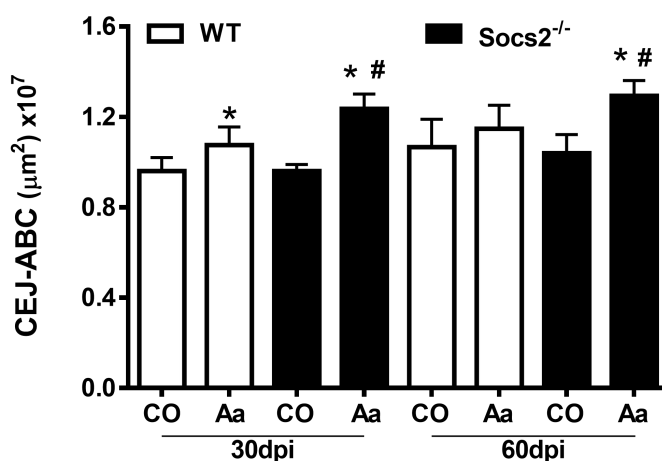


FIGURA 3. Perda óssea alveolar de animais WT e *Socs2*^{-/-}. Avaliação da extensão da perda óssea alveolar nas maxilas feita 30 e 60 dias pós-infecção com *A. actinomycetemcomitans* em camundongos WT e *Socs2*^{-/-}. A barra indica média +- desvio padrão da média. * $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle e # $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados camundongos WT e *Socs2*^{-/-}, avaliados por teste t de Student.

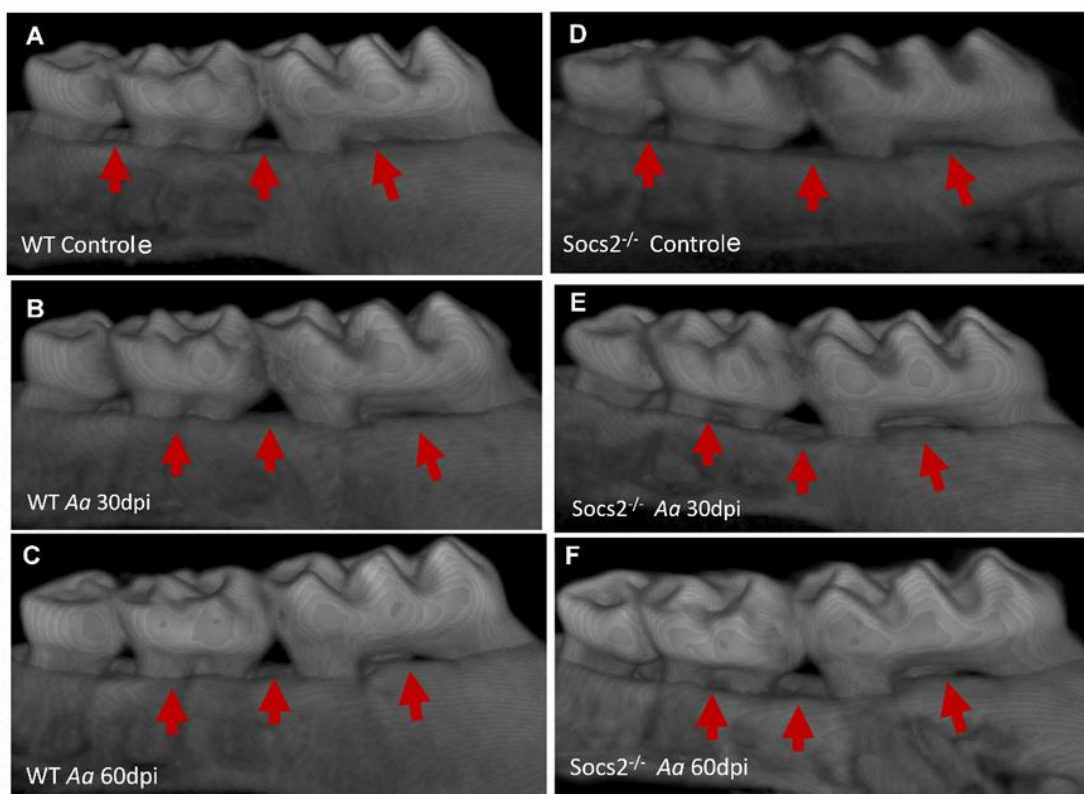


FIGURA 4. Fotos representativas da perda óssea alveolar na maxila de camundongos WT e *Socs2*^{-/-} infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Perda óssea alveolar avaliada nos primeiros e segundos molares superiores de camundongos WT controles (A), WT 30 dias pós-infecção (B), WT 60 dias pós-infecção (C) comparativamente a animais *Socs2*^{-/-} controles (D), *Socs2*^{-/-} 30 dias pós-infecção (E), *Socs2*^{-/-} 60 dias pós-infecção (F). Setas vermelhas indicam a crista óssea alveolar.

4.1.3 A ausência de SOCS2 resulta em parâmetros ósseos maxilares alterados

Para avaliar se a deficiência de SOCS2 afeta o fenótipo do osso maxilar, os parâmetros ósseos na maxila foram analisados por MicroCT. A análise óssea de camundongos WT e *Socs2*^{-/-} em estado basal ou após infecção mostrou diferenças significativas (Figs. 5,6 e 7). Os camundongos WT infectados mostraram diminuição da densidade mineral óssea (BMD), do volume ósseo (BV), do volume do osso trabecular/volume tecidual (BV/TV) e da espessura trabecular (Tb.Th) quando comparados aos camundongos WT controle 30 ou 60 dpi (Figs.5A-B,E-F; 6 e 7). A ausência de SOCS2 induziu características osteopênicas nos maxilares, conforme demonstrado por diminuições em vários parâmetros ósseos, tais como: BMD, BV, BV / TV, Tb. Th, e número trabecular (Tb. N), e nenhuma diferença na separação trabecular (Tb.Sp) em 30 (Figs.5C-D, 6 e 7) e 60 dpi (Figs.5E-F, 6 e 7). No entanto, os camundongos *Socs2*^{-/-} não apresentaram uma redução visível nos parâmetros estruturais ósseos após a infecção com *Aa* (Figs. 5, 6 e 7).

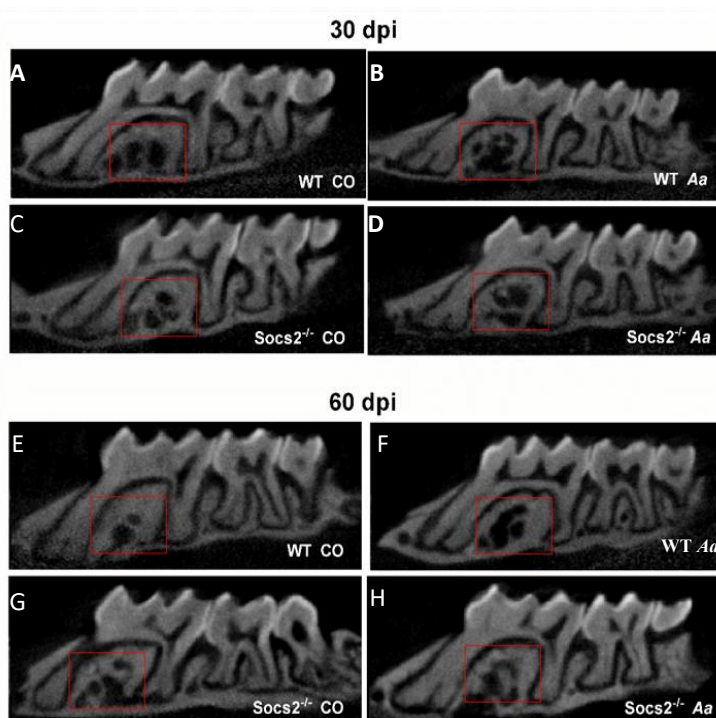


Figura 5. Fotos representativas obtidas por MicroCT da região óssea alveolar da maxila entre as raízes dos primeiros molares superiores. Imagens representativas de MicroCT da maxila após 30 dias de infecção com *A. actinomycetemcomitans* em animais WT controle (A), WT infectado (B), *Socs2*^{-/-} controle (C) e *Socs2*^{-/-} infectado. Imagens representativas de MicroCT da maxila após 60dpi em animais WT controle (E), WT infectado (F), *Socs2*^{-/-} controle (G) e *Socs2*^{-/-} infectado (H). O retângulo vermelho representa a área analisada

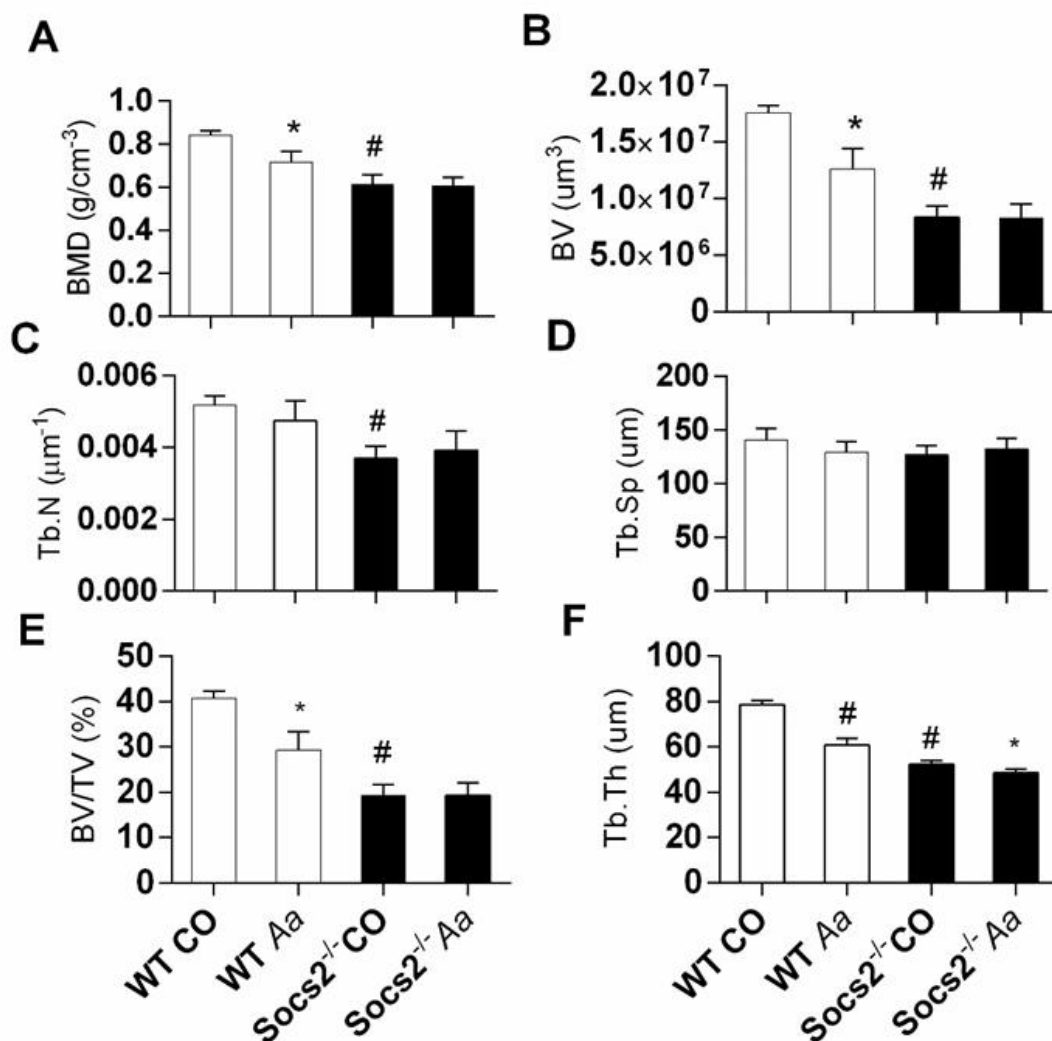


Figura 6. Parâmetros ósseos obtidos por MicroCT da região óssea alveolar entre as raízes dos primeiros molares superiores 30 dias após a infecção com *A. actinomycetemcomitans*. A) BMD: densidade mineral óssea; B) VB: volume ósseo; C) Tb.N: número trabecular; D) Tb.Sp: separação trabecular; E) BV/TV: volume ósseo percentual; F) Tb.Th: espessura trabecular. A barra indica média +/- desvio padrão da média. * $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significante quando comparados ao controle e # $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significante quando comparados camundongos WT com *SocS2*^{-/-}, avaliados por teste t de Student.

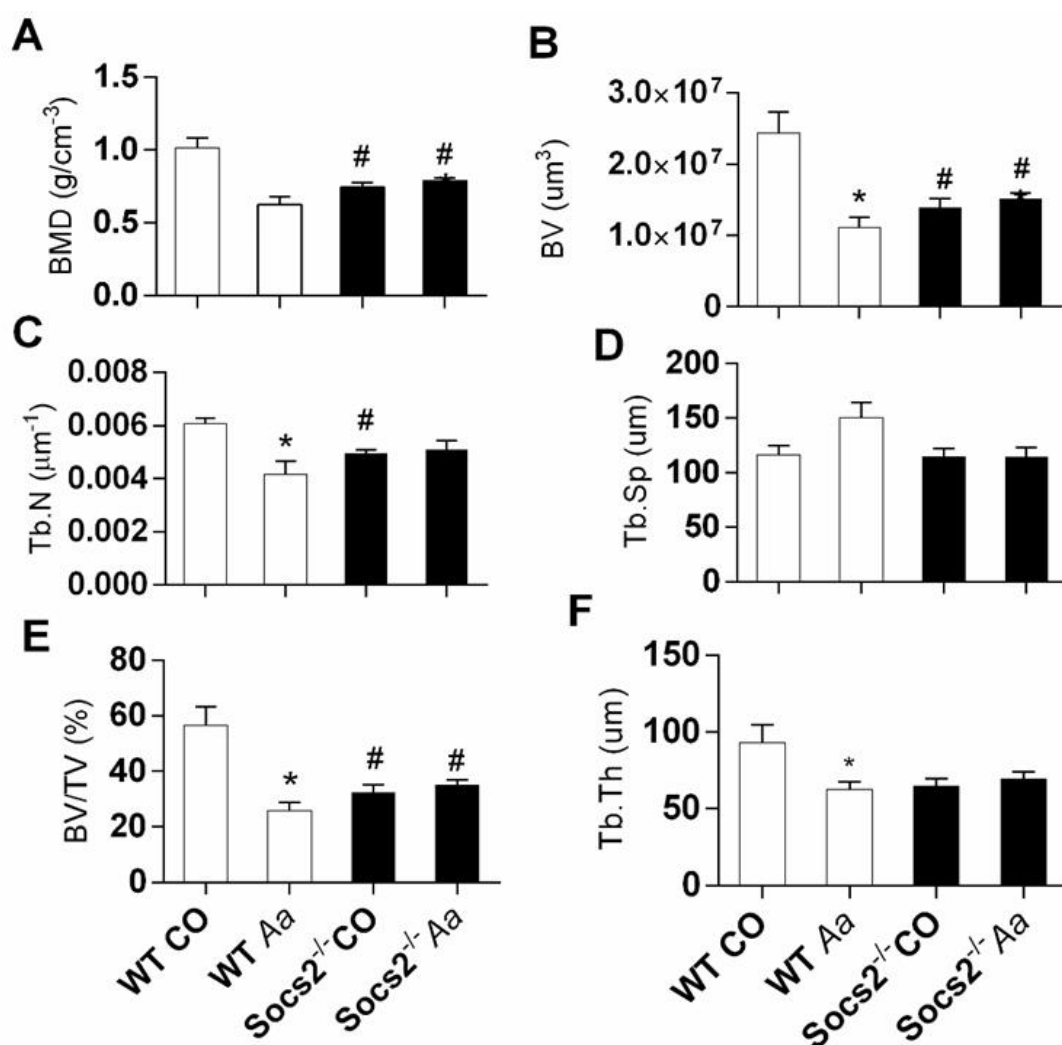


Figura 7. Parâmetros ósseos obtidos por MicroCT da região óssea alveolar entre as raízes dos primeiros molares 60 dias após a infecção com *A. actinomycetemcomitans*. A) BMD: densidade mineral óssea; B) VB: volume ósseo; C) Tb.N: número trabecular; D) Tb.Sp: separação trabecular; E) BV/TV: volume ósseo percentual; F) Tb.Th: espessura trabecular. A barra indica média \pm desvio padrão da média. * $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle e # $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados camundongos WT com SocS2^{-/-}, avaliados por teste t de Student.

4.1.4 A ausência de SOCS2 está relacionada a níveis reduzidos de TNF e IL-6 nos tecidos periodontais após a infecção.

Uma vez que diversas citocinas têm sido implicadas na patogênese da doença periodontal (SILVA et al., 2007), e visto que a deficiência de SOCS2 levou a uma maior perda óssea alveolar, foi avaliado se essa proteína estaria envolvida na regulação do processo inflamatório. Desse modo, o passo seguinte foi caracterizar a cinética e o padrão de expressão dos mediadores inflamatórios durante o curso da

doença periodontal experimental. Assim, camundongos WT e *Socs2*^{-/-} controles ou infectados com *Aa*, após o período experimental, foram eutanasiados e tiveram os tecidos periodontais removidos e homogeneizados em tampão com inibidores de proteases. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado e usado para as análises da produção de TNF, IL-6, IFN- γ , IL-17, IL-1 β , IL-10 e TGF- β .

Os animais WT apresentaram aumento significativo nos níveis de TNF após 15 e 60 dpi (Fig. 8A) e aumento significativo de IL-6 15 e 30 dpi (Fig. 8B), enquanto camundongos *Socs2*^{-/-} não apresentaram aumento significativo de TNF e IL-6 nos mesmos períodos avaliados (Fig. 8A e 8B). Além disso, animais WT infectados apresentaram maiores níveis de TNF e IL-6, de maneira significativa, quando comparados a animais *Socs2*^{-/-} após 15 dias de infecção.

A infecção com *Aa* induziu um aumento significativo nos níveis de IL-1 β tanto em camundongos WT, nos 15 e 30 dpi, e em camundongos *Socs2*^{-/-} no 30 dpi. Porém, não foram observadas diferenças significativas entre a produção dessa citocina quando comparamos animais WT e *Socs2*^{-/-} (Fig. 10C).

Do mesmo modo, observamos um aumento significativo nos níveis de IFN- γ em camundongos WT infectados comparativamente aos camundongos WT controles 30 ou 60 dpi e após 30 dpi em animais *Socs2*^{-/-}. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas na produção dessa citocina quando comparamos animais WT e *Socs2*^{-/-} (Fig. 10D).

Além disso, a infecção com *Aa* induziu um aumento significativo nos níveis de IL-17 em camundongos WT, 15 e 60 dpi, porém não foram observadas alterações nos níveis dessa citocina em animais *Socs2*^{-/-} nos períodos avaliados (Fig. 10E).

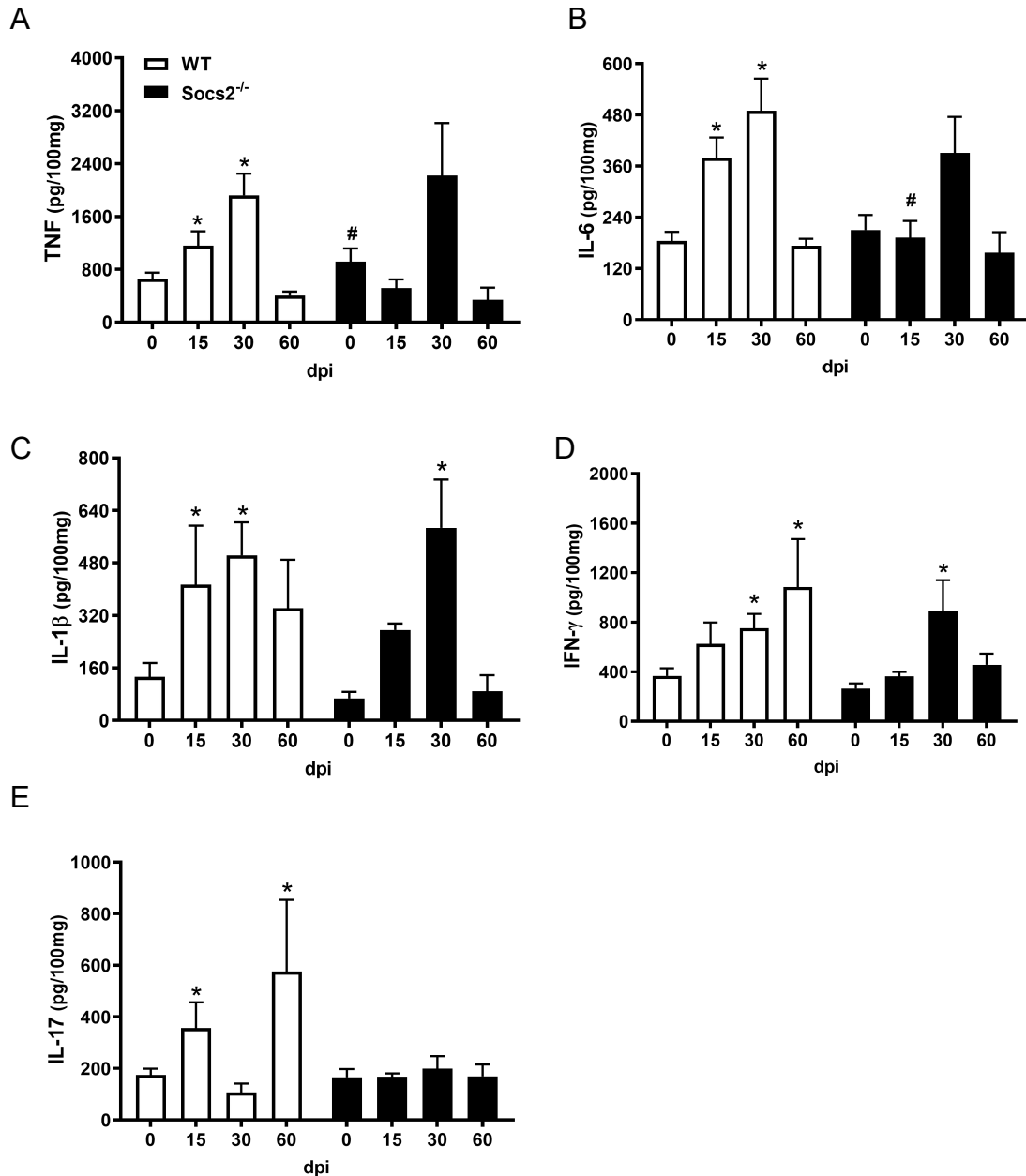


FIGURA 8. Quantificação de citocinas pro-inflamatórias em camundongos WT e *Socs2*^{-/-} após infecção com *A. actinomycetemcomitans*. A produção das citocinas foi avaliada por ELISA nos períodos de 15, 30 e 60 dias pós-infecção, comparativamente a camundongos WT no mesmo período. Os resultados são expressos como pg/100 mg de tecido por animal. A- TNF, B- IL-6, C- IL-1β, D-IFN-γ, E- IL-17. A barra indica média +- desvio padrão da média.*p ≤ 0,05 indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle e #p ≤ 0,05 indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados camundongos WT com *Socs2*^{-/-} avaliados por teste t de Student.

Avaliamos também a expressão de citocinas anti-inflamatórias nos tecidos periodontais dos camundongos WT e *Socs2*^{-/-} após infecção com *Aa*. A infecção com *Aa* induziu um aumento na produção de IL-10 em animais WT no 60 dpi (Fig. 9A). Não foi observada diferença na produção dessa citocina entre animais WT e *Socs2*^{-/-}.

Também não houve alterações nos níveis de TGF- β em todos os grupos e períodos observados (Fig. 9B).

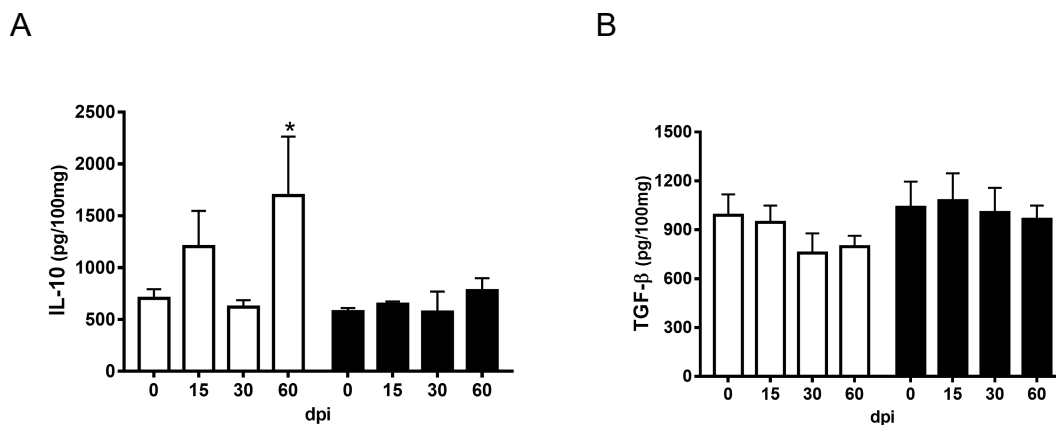


FIGURA 9. Quantificação de citocinas anti-inflamatórias em camundongos WT e *Socs2*^{-/-} após infecção com *A. actinomycetemcomitans*. A produção de citocinas foi avaliada por ELISA nos períodos de 15, 30 e 60 dias pós-infecção, comparativamente a camundongos WT no mesmo período. Os resultados são expressos como pg de citocina/100 mg de tecido por animal. A- IL-10, B- TGF- β . A barra indica média \pm desvio padrão da média. * $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle, avaliados por teste t de *Student*.

A importância dos mediadores lipídicos inflamatórios na patogênese da doença periodontal já foi previamente descrita na literatura (MADEIRA et al., 2013b). Além disso, alguns mediadores lipídicos pró-resolutivos estão associados à proteção contra a inflamação tecidual e a perda óssea alveolar (VAN DYKE et al., 2015). Nesse estudo, avaliamos a expressão de LXA₄, por ELISA, em amostras de maxilas de animais WT e *Socs2*^{-/-}, controles ou infectados com Aa. Os resultados mostram que a ausência de SOCS2 resultou em um aumento significativo nos níveis de LXA₄, nos 30 e 60 dpi com Aa (Fig. 10).

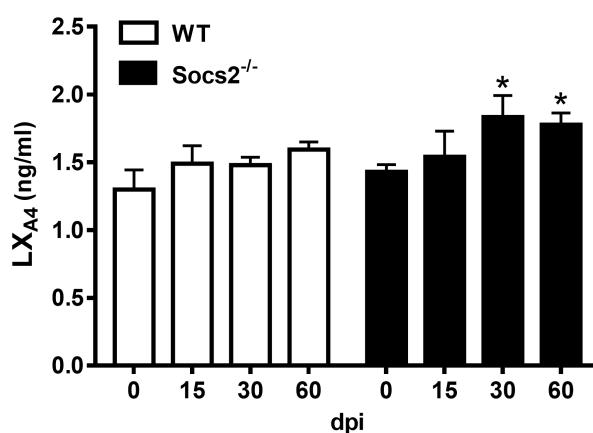


FIGURA 10. Quantificação das citocinas em camundongos WT e Soccs2^{-/-}. A produção de Lipoxina A4 foi avaliada por ELISA 15,30 e 60 dpi, em camundongos WT e Soccs2^{-/-}. A barra indica média +- desvio padrão da média.* $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle^{-/-}, avaliados por teste t de Student.

4.1.5 Fibroblastos deficientes em SOCS2 produzem menores níveis de citocinas pró-inflamatórias após estímulo com Aa.

Os fibroblastos representam uma célula importante no processo de osteoclastogênese, liberando citocinas que induzem a formação e ativação dos osteoclastos (GRAVES, 2008). Observamos um aumento da produção de TNF, IL-6 e IL-1 β , mas não de TGF- β , pelas células WT após estimulação com Aa, *in vitro*. A deficiência de SOCS2 foi associada a uma menor resposta inflamatória, com redução da produção de TNF, IL-6 e IL-1 β por fibroblastos, quando comparada aos fibroblastos WT infectados por Aa (Fig. 11).

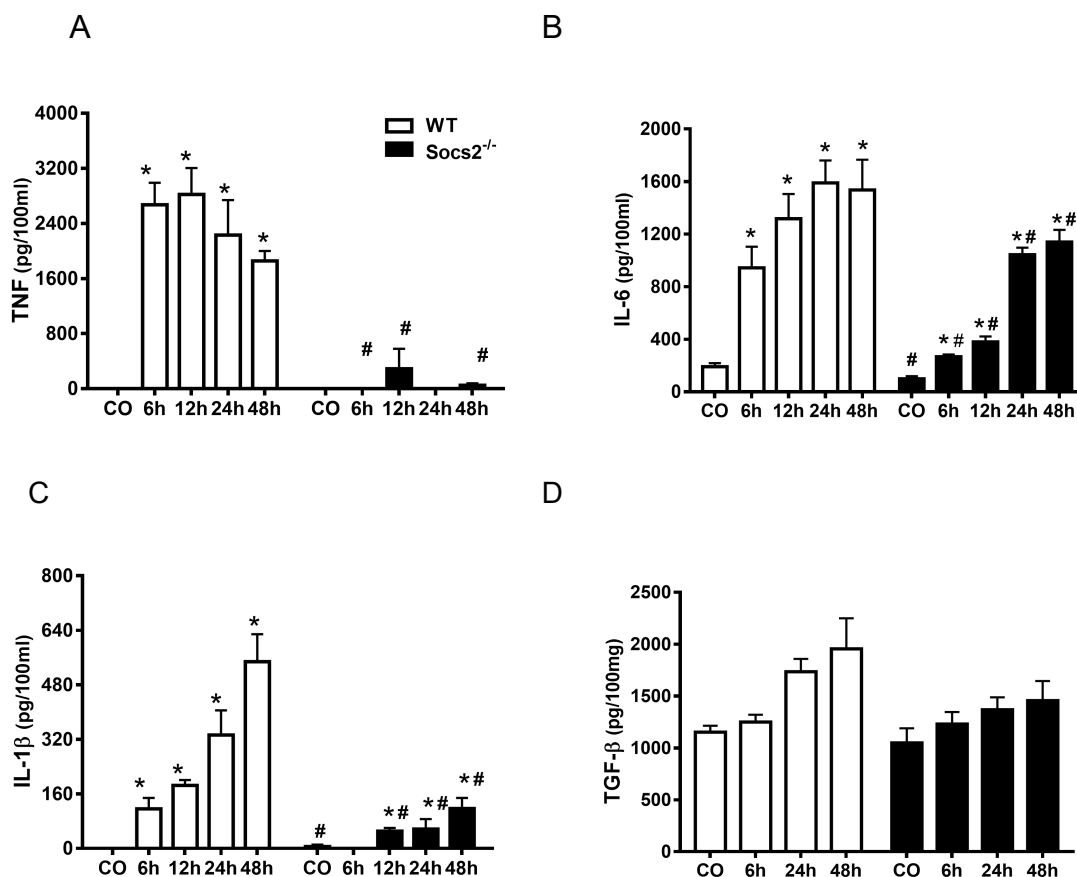


Figura 11. A ausência de SOCS2 em fibroblastos diminuiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias *in vitro*. (A) Fibroblastos periodontais de camundongos WT e *Socs2*^{-/-} foram isolados e infectados ou não com *Aa* (100: 1 bactéria / célula), os sobrenadantes foram coletados no tempo indicado e avaliados para a produção de TNF, (B) IL-6, (C) IL-1β e (D) TGF-β. A barra indica média ± desvio padrão da média. * $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle e # $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados camundongos WT com *Socs2*^{-/-}, avaliados por teste t de Student.

4.1.6 A ausência de SOCS2 modifica o influxo de neutrófilos após a infecção sem interferir com a expressão de RANKL

Como demonstrado, animais *Socs2*^{-/-} tiveram uma perda óssea significativamente maior que animais WT após infecção com *Aa*. A partir de então, o próximo passo foi investigar os mecanismos envolvidos com a maior perda óssea alveolar observada em animais *Socs2*^{-/-}.

Inicialmente, foi avaliado o padrão do recrutamento de neutrófilos nos tecidos periodontais nos camundongos, após infecção por *Aa*. Foram avaliados os níveis da enzima MPO nos tecidos periodontais de camundongos WT e *Socs2*^{-/-}, infectados com *Aa*, nos tempos de 15, 30 ou 60 dias após infecção. Os resultados mostram que

os animais WT não apresentaram alterações significativas de MPO. Entretanto, camundongos *Socs2*^{-/-}, apresentaram alterações significativas de MPO 15 e 30 dpi, quando comparados a camundongos WT (Fig. 12).

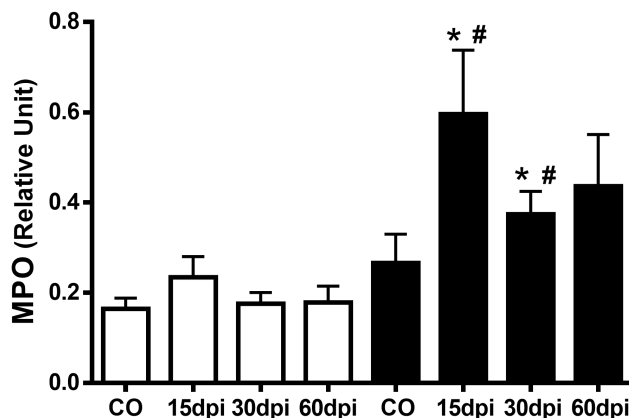


FIGURA 12. Quantificação de mieloperoxidase (MPO) nos tecidos periodontais de camundongos WT e *Socs2*^{-/-}. A produção da enzima foi avaliada nos tempos 15, 30 ou 60 pós-infecção. A barra indica média \pm desvio padrão da média. * $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle e # $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados camundongos WT com *Socs2*^{-/-}, avaliados por teste t de *Student*.

Os neutrófilos podem estar associados à destruição dos tecidos periodontais pela liberação de MPO, dentre outros mecanismos (EL KEBIR et al., 2008). Sendo assim, a presença de MPO nestes tecidos tem sido considerada um marcador de inflamação local (BORGES et al., 2007). Os neutrófilos são células que apresentam RANKL ligado à membrana, sendo capazes de interagir diretamente com células precursoras de osteoclastos (CHAKRAVARTI et al., 2009). Desse modo, avaliamos a expressão de RANKL de membrana, em cultura de neutrófilos purificados da medula óssea da tíbia e fêmur, de camundongos WT ou *Socs2*^{-/-}. Após estímulo com Aa ou AaLPS, foi feita a marcação com anticorpo específico para neutrófilos (Ly6G) e para RANKL de membrana das células, que foram avaliadas por citometria de fluxo. As figuras 14A e 14 B mostram a porcentagem de neutrófilos na cultura, obtida por cytospin e por citometria de fluxo, respectivamente. Em ambas as análises o valor de pureza da cultura ficou entre 70 - 80% de neutrófilos. A viabilidade celular foi realizada pela detecção da enzima lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante da cultura. A LDH é uma enzima citoplasmática e sua liberação no sobrenadante da cultura indica que houve lesão na membrana dessas células, comprometendo a viabilidade dessas células. Como podemos observar na figura 13C, não foram observadas alterações na viabilidade celular após 12 horas de

estímulo com a bactéria ou com o AaLPS. Curiosamente, após 24 horas de estímulo, houve redução nos níveis de LDH após estímulo com Aa ou AaLPS, em células de animais WT. Em células derivadas de animais *Socs2*^{-/-}, a redução de LDH foi observada somente 24 h após estímulo com Aa, demonstrando que as células estimuladas tiveram menores índices de morte que as células controle, ou seja, as células estavam viáveis durante o estudo.

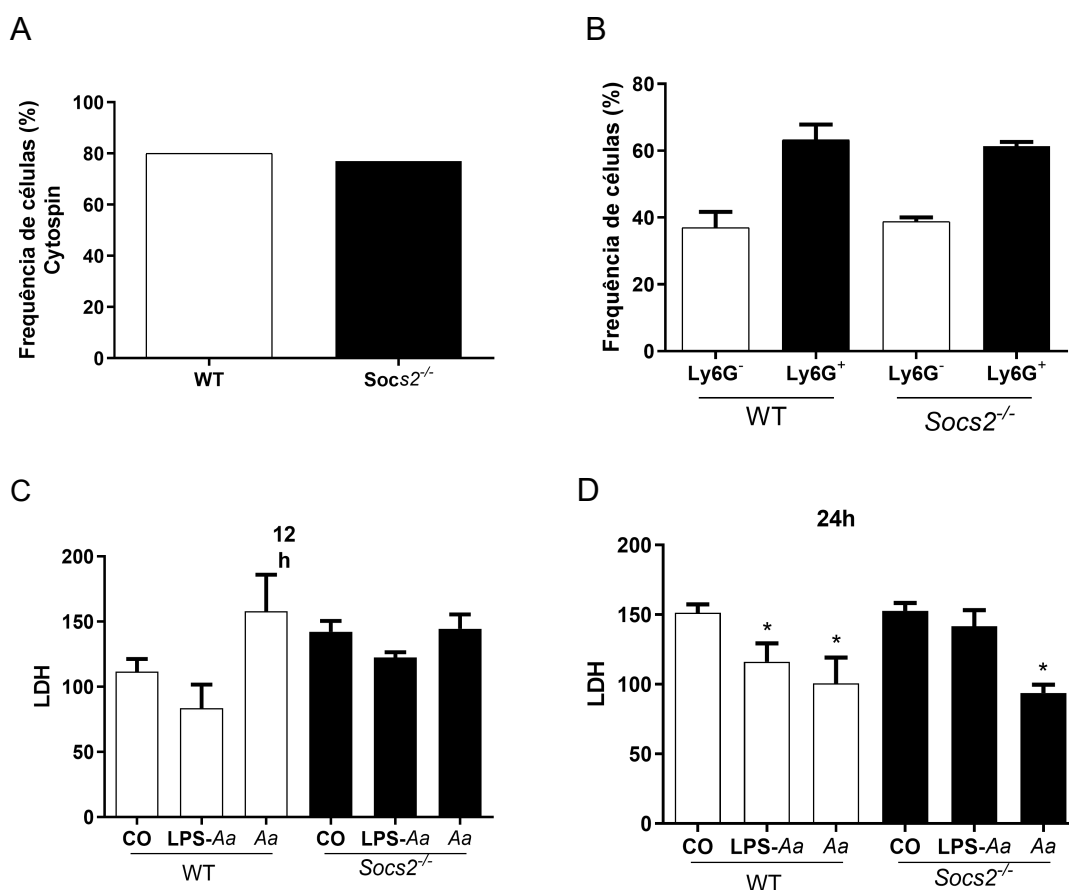


FIGURA 13. Caracterização da pureza e viabilidade da cultura de neutrófilos. As células foram removidas da medula óssea da tíbia e do fêmur de animais WT ou *Socs2*^{-/-} e, após purificação, as células foram verificadas quanto sua pureza, por cytopspin (A) e por FACS (B). A viabilidade celular foi realizada pela dosagem de LDH no sobrenadante dos neutrófilos, 12 horas (C) e 24 horas após o estímulo com Aa (5:1 bactéria/célula) ou LPS-Aa (1,25 µg / mL). A barra indica média +- desvio padrão da média. **p* ≤ 0,05 indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle, avaliados por teste t de *Student*.

Em seguida, foi avaliado se o estímulo com Aa ou AaLPS resultaria numa maior expressão de RANKL na membrana de neutrófilos. A Figura 14 mostra que o estímulo com Aa resultou em maiores números de células duplo positivas (Ly6G⁺/RANKL⁺), quando comparadas ao estímulo com AaLPS. Porém, não foram

observadas diferenças na expressão de RANKL de membrana em neutrófilos derivados de camundongos WT ou *Socs2*^{-/-}.

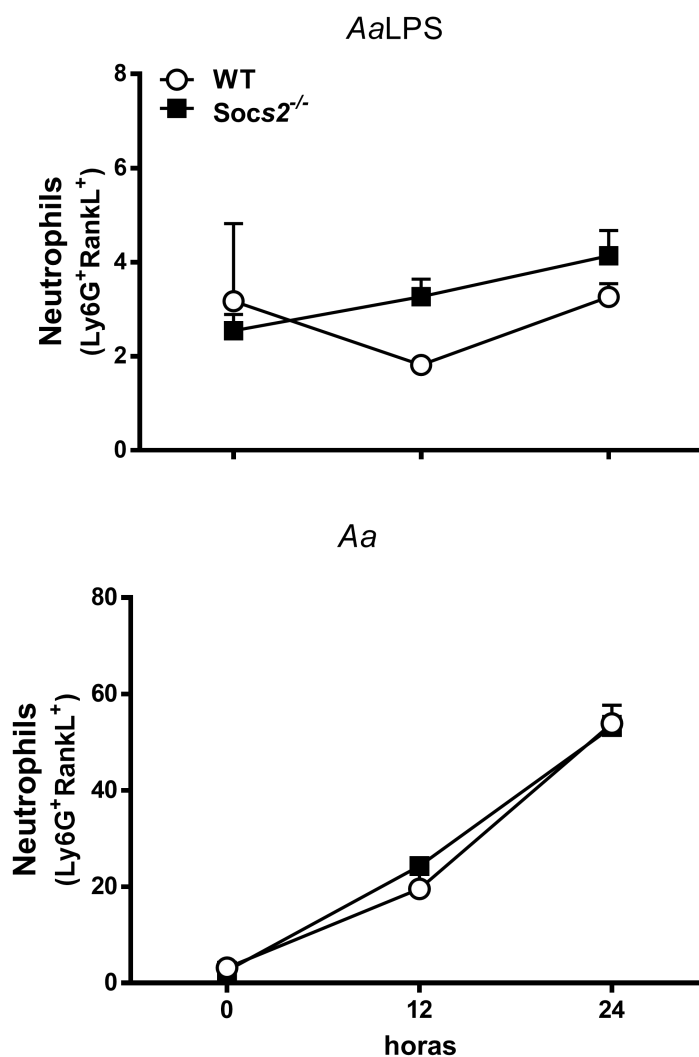


FIGURA 14. Expressão de RANKL de membrana por neutrófilos. Neutrófilos de camundongos machos WT ou *Socs2*^{-/-} foram isolados e infectados com *Aa* (5:1 bactéria/célula) ou LPS-*Aa* (1,25 µg / mL). A avaliação da expressão de RANKL de membrana, por FACS, foi realizada nos tempos indicados. A barra indica média \pm desvio padrão da média. * $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle, avaliados por teste Two Way ANOVA.

Em seguida foram avaliados os níveis de TNF liberados pelos neutrófilos 12 e 24 horas após o estímulo com *Aa* ou *AaLPS*. Novamente, o estímulo com *Aa* resultou no aumento dos níveis de TNF produzidos em comparação ao estímulo com *AaLPS* nos grupos avaliados. Neutrófilos derivados de animais WT não apresentaram produção significativa de TNF após estímulo com *AaLPS*. Entretanto, na ausência de SOCS2, foram observados níveis significativos de TNF 12 horas após estímulo com *AaLPS*, em comparação com neutrófilos derivados de animais WT. O estímulo com *Aa* resultou em níveis significativos de TNF após 12 horas em

células WT ou *Socs2*^{-/-}. Entretanto, após 24 horas a liberação de TNF foi maior em células derivadas de animais *Socs2*^{-/-} quando comparado células de animais WT (Figura 15).

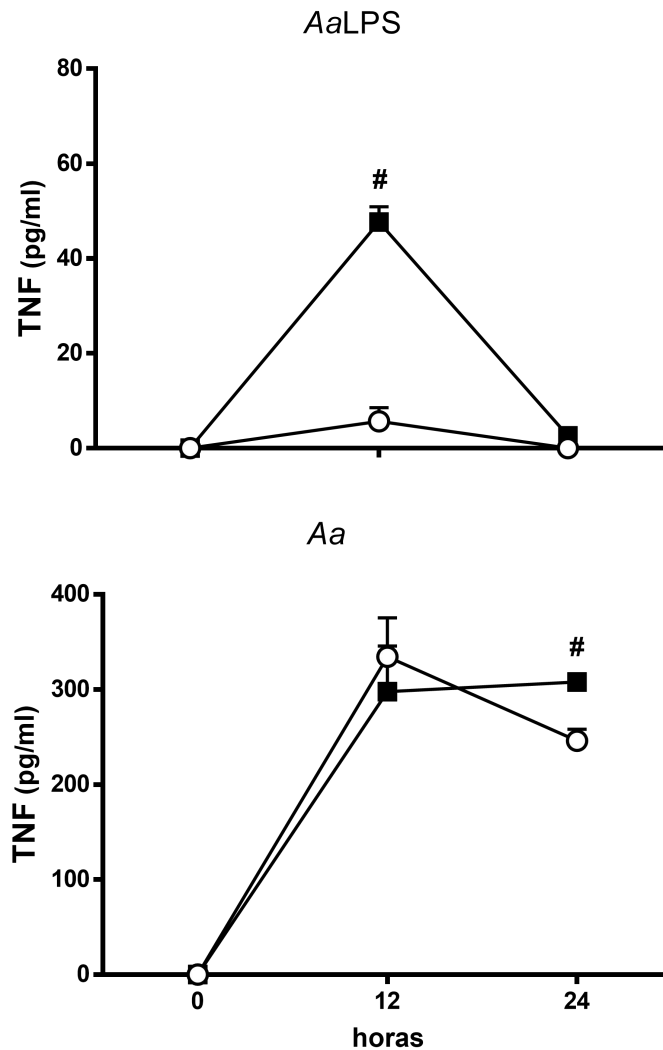


FIGURA 15. Determinação da produção de TNF por neutrófilos após estímulo com AaLPS ou Aa. Neutrófilos de camundongos machos WT ou *Socs2*^{-/-} foram isolados e infectados com *Aa* (5:1 bactéria/célula) ou AaLPS (1,25 µg / mL). Avaliou-se a expressão de TNF no sobrenadante da cultura de neutrófilos nos tempos indicados. A barra indica média +- desvio padrão da média. #*p* ≤ 0,05 indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados camundongos WT com *Socs2*^{-/-}, avaliados por teste Two Way ANOVA.

4.1.7 A ausência de SOCS2 não modifica a produção de marcadores de reabsorção óssea nos tecidos periodontais de camundongos após a infecção com *Aa*.

O próximo objetivo foi avaliar o papel de SOCS2 na modulação de fatores envolvidos na diferenciação e ativação de osteoclastos. Para isso, foi utilizado o ensaio imunoenzimático (ELISA) para mensuração dos fatores osteoclastogênicos RANKL e OPG nos 15, 30 e 60 dpi com *Aa*. Não foi observada diferença significativa na proporção RANKL/OPG em animais WT ou *Socs2*^{-/-} (Fig. 16A). Além disso, foi avaliada a produção de RANKL por fibroblastos periodontais derivados de camundongos WT ou *Socs2*^{-/-} após estímulo com *Aa* (100:1 bactéria/célula). Ambos os grupos apresentaram aumento da produção de RANKL após estímulo com *Aa*. Porém, fibroblastos derivados de camundongos *Socs2*^{-/-} produziram menores níveis de RANKL quando comparados a animais WT, 12 e 24 horas após estímulo com a bactéria (Fig. 16B).

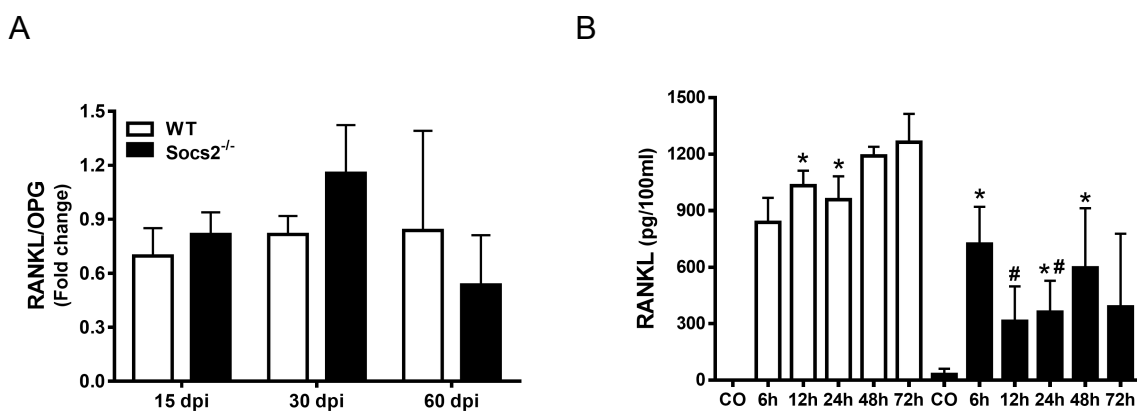


FIGURA 16. Determinação da produção de RANKL em tecidos periodontais e por fibroblastos gengivais após estímulo com *Aa*. A produção de RANKL foi avaliada nos tempos 15, 30 ou 60 após infecção, nos tecidos periodontais de camundongos WT e *Socs2*^{-/-} (A). Produção de RANKL no sobrenadante de cultura de fibroblastos derivados de WT e *Socs2*^{-/-} e infectados com *Aa* (100: 1 bactéria / célula), os sobrenadantes foram coletados no tempo indicado (B). A barra indica média +- desvio padrão da média. * $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle e # $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados camundongos WT com *Socs2*^{-/-}, avaliados por teste t de Student.

5.1.8 A ausência de SOCS2 modifica a quantidade de células TRAP positivas nos tecidos periodontais após a infecção com Aa.

Uma vez que a perda óssea alveolar foi maior em animais *Socs2*^{-/-} infectados com Aa quando comparados ao grupo WT infectado, foi analisada a quantidade de osteoclastos presentes na região afetada. Para isso, foi realizado o ensaio enzimático de TRAP nas lâminas histológicas. Comparativamente ao grupo controle, o grupo WT infectado apresentou um aumento no número de células TRAP positivas na região da crista óssea alveolar, 30 e 60 dpi. Por outro lado, os animais *Socs2*^{-/-} apresentaram maior número de células TRAP positivas já nos animais controles quando comparado aos animais WT, porém esse número se manteve elevado e sem alterações significativas após a infecção (Fig.17A). A figura 18B mostra imagens representativas de cada grupo experimental e seus controles com indicações dos osteoclastos marcados em vermelho por TRAP.

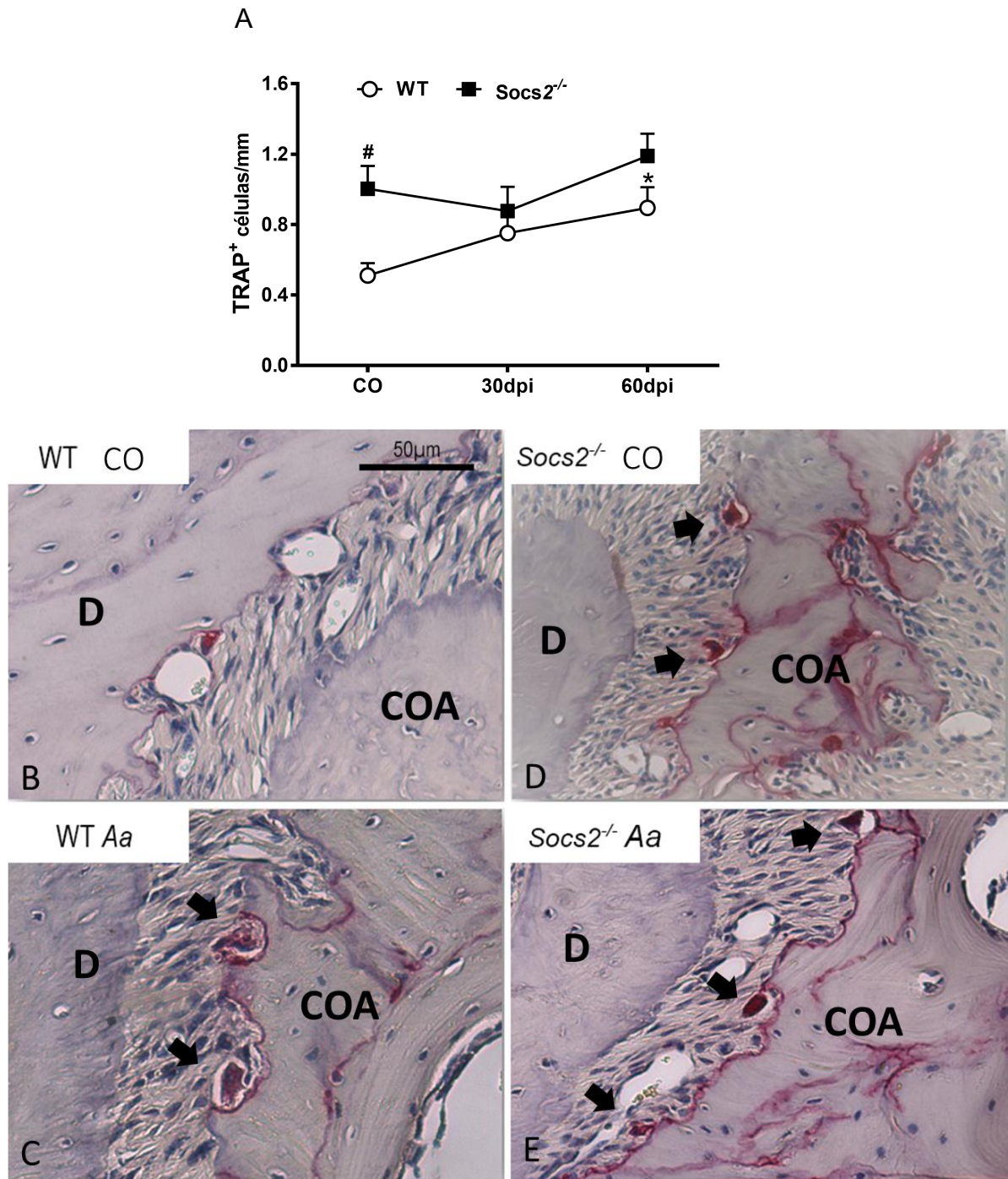


FIGURA 17. Quantificação e fotos representativas das células marcadas com TRAP 30 ou 60 dias após a infecção. As células marcadas com coloração vermelha presentes na área de perda óssea alveolar foram submetidas a contagem. Quatro lâminas de cada animal com quatro cortes seriados foram submetidos à contagem (A). As células TRAP positivas indicadas pelas setas próxima à crista alveolar de primeiros molares de animais WT e Socs2^{-/-} foram submetidas à contagem. A-WT Controle, B- WT infectado, C- Socs2^{-/-} controle, D- Socs2^{-/-} infectado. Os Cortes histológicos são de 30 dias após a infecção e foram fotografados no aumento 40X (B). A barra indica média +- desvio padrão da média. * $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle e # $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados camundongos WT com Socs2^{-/-}, avaliados por teste Two Way ANOVA. Crista óssea alveolar (COA). D (dentina).

4.2 Cultura de Osteoclastos

4.2.1 Estímulo com AaLPS induz a expressão de SOCS2 em osteoclastos *in vitro*

Para avaliar se o estímulo com AaLPS induziria a expressão de *Socs2* em osteoclastos, *in vitro*, células precursoras de osteoclastos foram removidas da medula óssea de animais WT, cultivadas com M-CSF, RANKL e estimuladas com AaLPS. Foi observado um aumento na expressão de *Socs2* nessas células 48 h após a estimulação com LPS *in vitro* (Fig. 18).

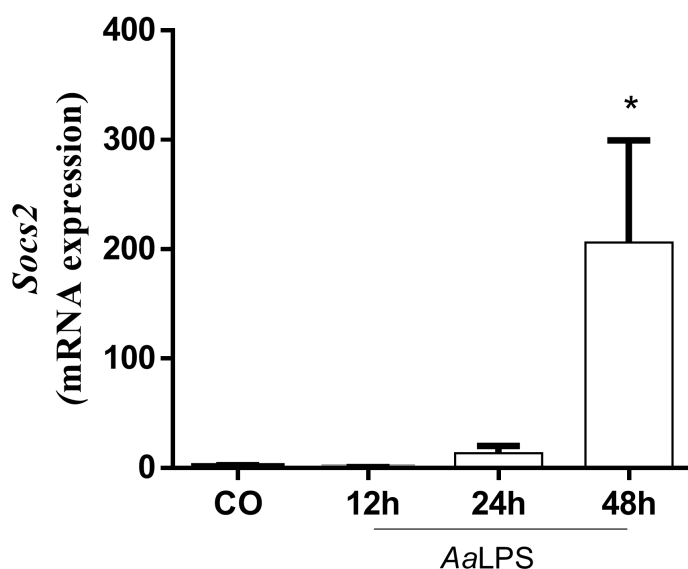


FIGURA 18. Determinação da expressão de *Socs2* em osteoclastos. Cultura de células da medula óssea provenientes de animais WT ou *Socs2*^{-/-} estimulados com M-CSF (30 ng/mL) e RANKL (50 ng/mL) e estimuladas com AaLPS (1,25 ng/mL), coletadas após 12, 24 ou 48 horas de cultivo. As células foram submetidas à avaliação da expressão de *Socs2* por qPCR. Os valores são em relação à expressão do gene constitutivo *Gapdh*. A barra indica média \pm desvio padrão da média. * $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle, avaliados por teste One Way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni.

4.2.2 SOCS2 é importante para a formação osteoclástica

Uma vez que foram observadas diferenças na quantidade de células TRAP-positiva nos tecidos periodontais de camundongos WT ou *Socs2*^{-/-} infectados com Aa, o próximo passo foi investigar se SOCS2 interferiria na diferenciação de osteoclastos, *in vitro*. Para tanto, células da medula óssea foram removidas do fêmur e da tíbia de animais WT e *Socs2*^{-/-} e cultivadas na presença de MCS-F, RANKL ou

RANKL+AaLPS, para induzir a diferenciação em osteoclastos. Os resultados mostram que o estímulo com RANKL resultou no aumento do número de células TRAP-positivo em todos os grupos. E o estímulo com RANKL+AaLPS resultou no aumento do número de células TRAP-positivas apenas nas células de animais *Socs2*^{-/-}. Além disso, células de animais *Socs2*^{-/-} apresentaram maior diferenciação em relação às células de animais WT (Fig. 19A). Em relação ao estímulo com AaLPS, foi observada uma maior quantidade de células multinucleadas quando comparada ao estímulo apenas com RANKL, o que também foi mais significativa em células *Socs2*^{-/-} (Fig. 19A).

Em relação à viabilidade celular após os estímulos, foi observado um aumento significativo nos índices de morte celular após estímulo com RANKL, sendo mais significativo após estímulo com RANKL+AaLPS, demonstrado pela dosagem de LDH no sobrenadante de osteoclastos (Fig. 19B). As imagens representativas dos resultados descritos acima estão na representados na Figura 20.

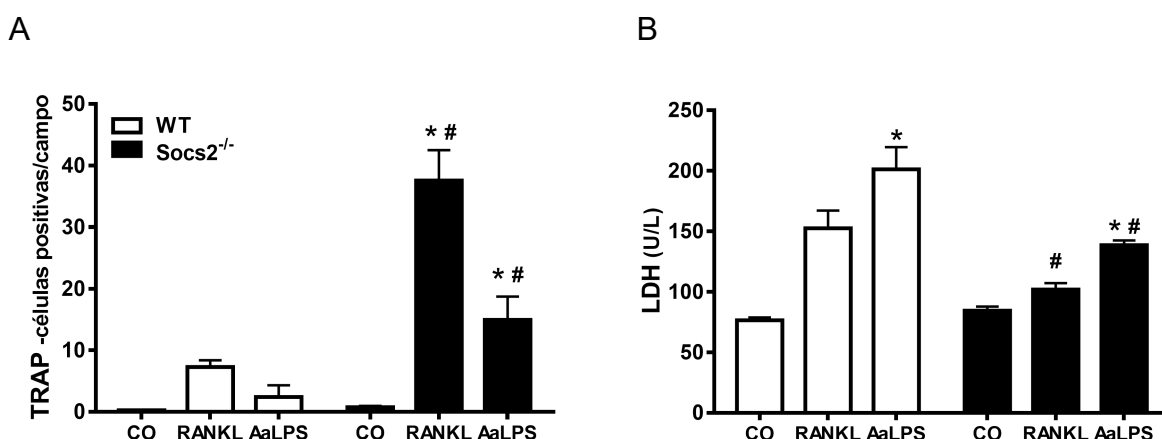


FIGURA 19. Quantificação do número de osteoclastos *in vitro*. (A). Avaliação do número de osteoclastos *in vitro*, a partir de células de camundongos WT ou *Socs2*^{-/-} com MCS-F, RANKL ou RANKL+ AaLPS, após 48 horas de estímulo. A barra indica média +- desvio padrão da média (B) Quantificação da viabilidade celular pela dosagem da enzima LDH em cultura de osteoclastos após estímulo com RANKL e LPS de Aa. A barra indica média +- desvio padrão da média. * $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle e # $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados camundongos WT com *Socs2*^{-/-}, avaliados por teste t de Student.

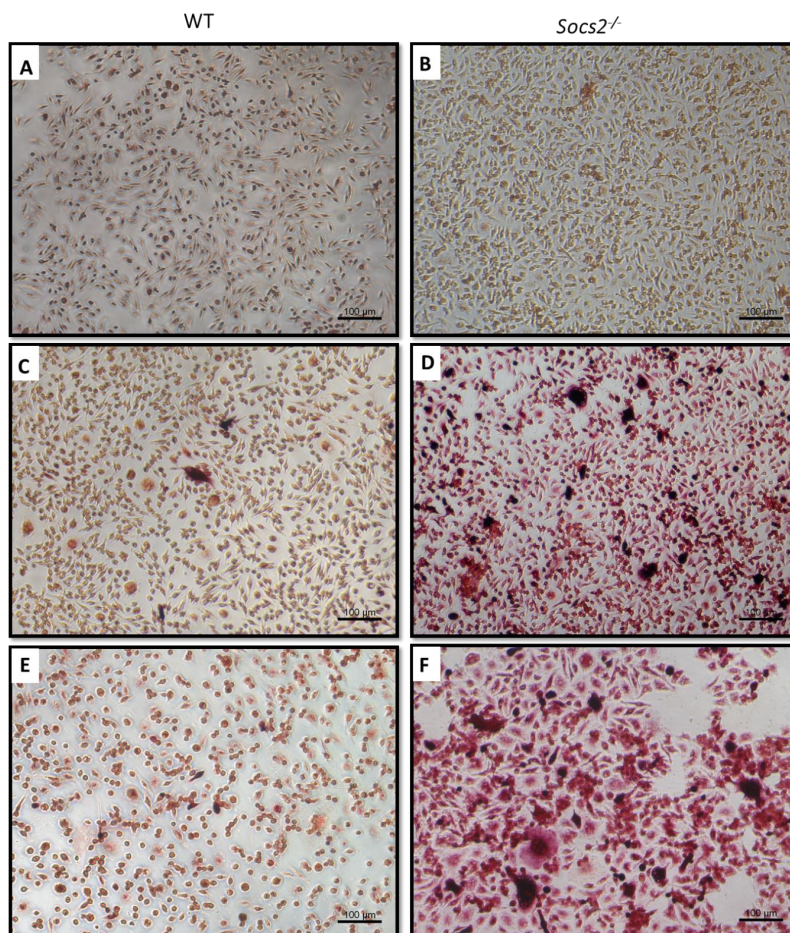


FIGURA 20. Fotos representativas da cultura de osteoclastos. Após 48 horas de estímulo com AaLPS, as células foram submetidas à marcação com TRAP. As células provenientes de animais WT ou *Socs2*^{-/-} foram cultivadas na presença de MCS-F (30 ng/mL) em A e B, de MCS-F (30 ng/mL) e RANKL (50 ng/mL) em C e D e de MCS-F (30 ng/mL), RANKL (50 ng/mL), AaLPS (1,25 ng/mL) em E e F. Fotos fotografadas no aumento de 10 X.

Em relação à produção de citocinas por osteoclastos foi observado que, após estímulo com AaLPS, houve um aumento significativo da produção de TNF e IL-6. As células provenientes de animais *Socs2*^{-/-} apresentaram quantidades significativamente reduzidas de TNF (Fig. 21A) e IL-6 (Fig. 21B), resultados que corroboram com os observados nos experimentos *in vivo*.

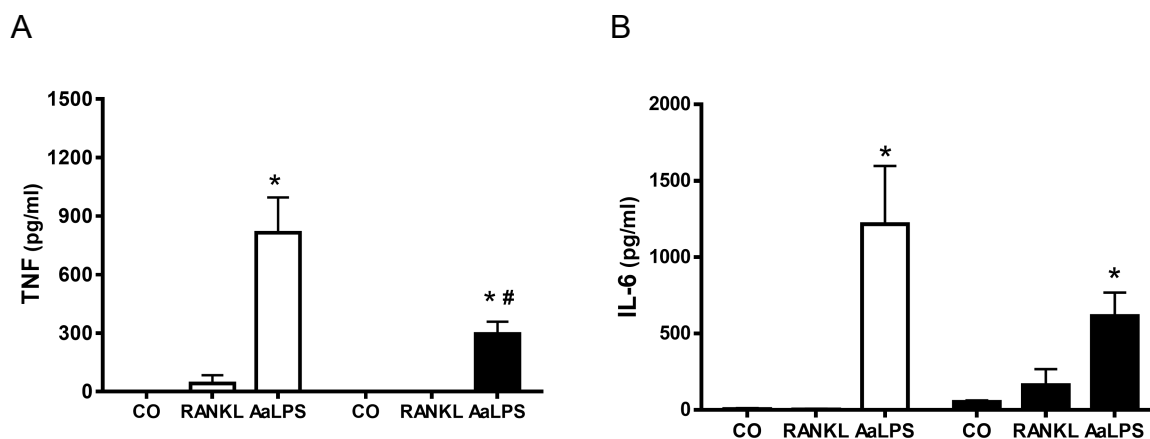


FIGURA 21. Determinação da expressão de TNF e IL-6 por osteoclastos. Cultura de células da medula óssea provenientes de animais WT ou *Socs2*^{-/-} cultivadas com M-CSF (30 ng/mL), RANKL (50 ng/mL) e estimuladas com LPS-Aa (1,25 ng/mL), coletadas após 48 horas de cultivo. As células foram submetidas à avaliação da produção de TNF e IL-6 por ELISA. A barra indica média +/- desvio padrão da média. * $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle e # $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados camundongos WT com *Socs2*^{-/-}, avaliados por teste t de Student.

4.2.3 SOCS2 modula a expressão de *Socs1* e *Socs3* em osteoclastos *in vitro*

Como já citado anteriormente, as proteínas da família SOCS têm o potencial de modularem umas às outras. Assim, SOCS2 pode regular a expressão de outros membros, incluindo SOCS1 e SOCS3 (RICO-BAUTISTA; FLORES-MORALES; FERNÁNDEZ-PÉREZ, 2006), efeitos que podem eventualmente resultar em função aumentada de certas citocinas. Sendo assim, foi avaliada a expressão de *Socs1* e *Socs3* em osteoclastos derivados de animais WT comparativamente com osteoclastos derivados de camundongos *Socs2*^{-/-}, após estímulo com LPS de Aa. Os resultados mostram que osteoclastos WT não alteram a expressão de *Socs1* (Fig. 22 A) e aumentam a expressão de *Socs3* de maneira significativa, 24 horas após estímulo com AaLPS (Fig. 22B). Na ausência de *Socs2*, osteoclastos mostraram maior expressão de *Socs1* 12 horas após estímulo com AaLPS (Fig. 22A), e de *Socs3* 12 e 24 horas após o mesmo estímulo (Fig. 22B).

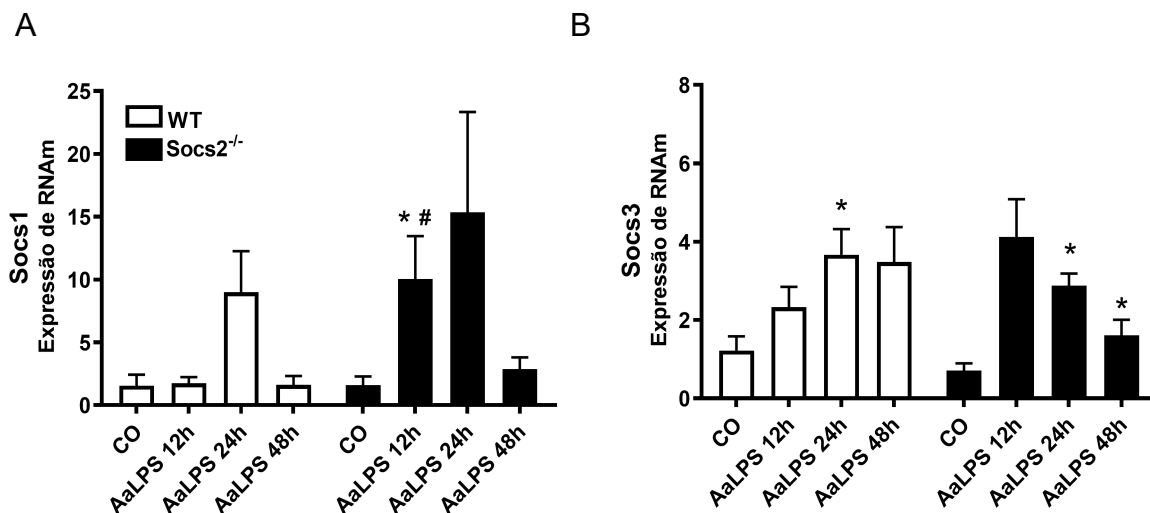


FIGURA 22. Determinação da expressão gênica de *Socs1* e *Socs3* em osteoclastos. Cultura de células da medula óssea provenientes de animais WT ou *Socs2*^{-/-} estimulados com M-CSF (30 ng/mL), RANKL (50 ng/mL) e estimuladas com AaLPS (1,25 ng/mL) coletadas após 12, 24 ou 48 horas de cultivo. As células foram submetidas à avaliação da expressão de *Socs1* e *Socs3* por qPCR. Os valores são em relação à expressão do gene constitutivo *Gapdh*. A barra indica média +- desvio padrão da média. * $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle e # $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados camundongos WT com *Socs2*^{-/-}, avaliados por teste t de Student.

4.2.4 SOCS2 modula sinalização de LPS-Aa em osteoclastos *in vitro*

O LPS é um componente da membrana externa das bactérias Gram-negativas. Ele liga-se a receptores TLRs expressos em muitas células (MAEKAWA et al., 2014) e induz uma resposta imune contribuindo para diferenciação e atividade de osteoclastos (CHAKRAVARTI et al., 2009; MADEIRA et al., 2012). Foi detectado maiores níveis de expressão de mRNA de *Tlr4* em osteoclastos derivados de camundongos *Socs2*^{-/-}, 48 horas após o estímulo com AaLPS (Fig. 23A). Porém, nenhuma alteração foi observada na expressão de *Myd88*, uma importante molécula que suporta a sinalização desse receptor (Fig. 23B).

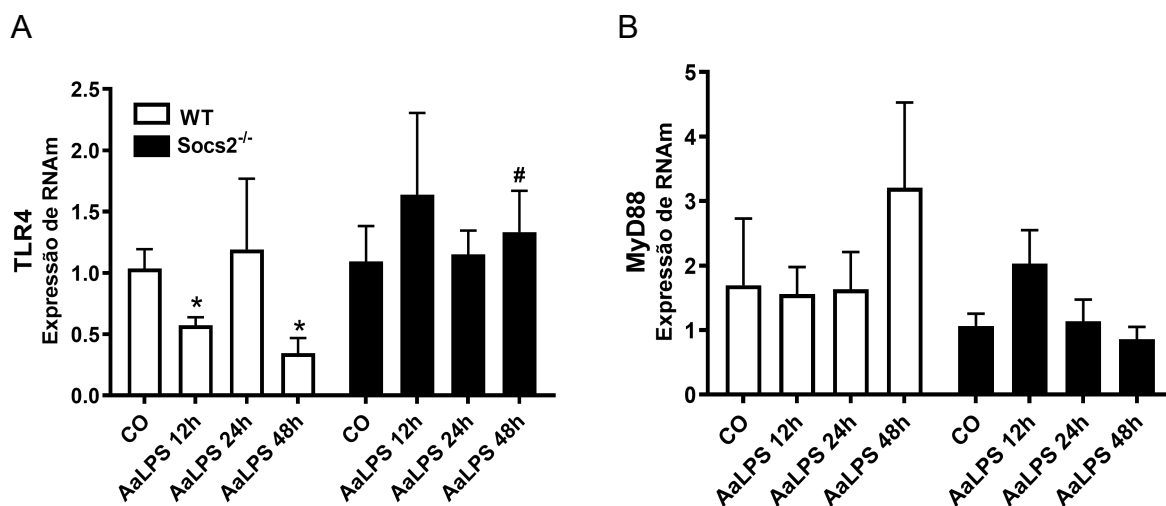


FIGURA 23. Determinação da expressão de *Tlr4* e *Myd88* em osteoclastos. Cultura de células da medula óssea provenientes de animais WT ou *Socs2*^{-/-} estimulados com M-CSF (30 ng/mL), RANKL (50 ng/mL) e estimuladas com AaLPS (1,25 ng/mL), coletadas após 12, 24 ou 48 horas de cultivo. As células foram submetidas à avaliação da expressão de *Tlr4* e *Myd88* por qPCR. Os valores são em relação à expressão do gene constitutivo *Gapdh*. A barra indica média \pm desvio padrão da média. * $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle e # $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados camundongos WT com *Socs2*^{-/-}, avaliados por teste t de Student.

4.2.5 SOCS2 modula vias de sinalização relacionadas com a osteoclastogênese

A diferenciação e função dos osteoclastos são reguladas por vários genes específicos (SIMS; VRAHNAS, 2014). Para investigar os mecanismos subjacentes à estimulação da osteoclastogênese na ausência de SOCS2, foi realizada a avaliação da expressão de genes relacionados à diferenciação de osteoclastos. Osteoclastos derivados de camundongos WT ou *Socs2*^{-/-} exibiram expressão semelhante de mRNA de *Traf6* (Fig. 24A), *Ck* (Fig. 24B), *Rank* (Fig. 24C), após estímulo com MCS-F ou MCS-F+RANKL+AaLPS. Em relação à expressão de *Ahr* foi observada uma diminuição em osteoclastos *Socs2*^{-/-}, 48 horas após o estímulo com AaLPS, quando comparados a osteoclastos WT (Fig. 24D).

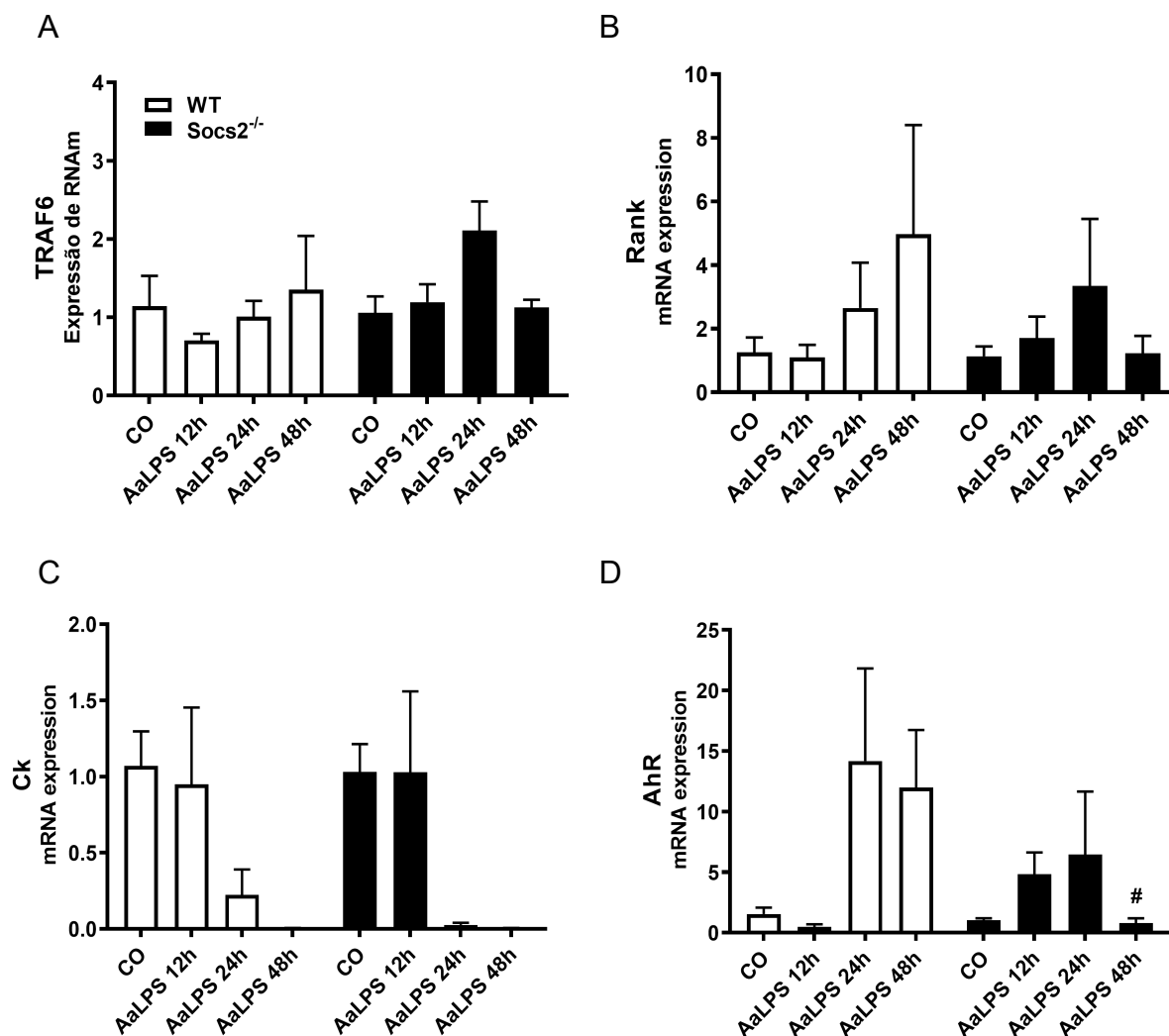


FIGURA 24. Determinação da expressão de *Traf6*, *Rank*, *Ck* e *Ahr* em osteoclastos. Cultura de células da medula óssea provenientes de animais WT ou *Socs2*^{-/-} estimulados com M-CSF (30 ng/mL) ou M-CSF (30 ng/mL), RANKL (50 ng/mL) e AaLPS (1,25 ng/mL) coletadas após 12, 24 ou 48 horas de cultivo. As células foram submetidas à avaliação da expressão de *Traf6*, *Rank*, *Ck* e *Ahr* por qPCR. Os valores são em relação à expressão do gene constitutivo *Gapdh*. A barra indica média \pm desvio padrão da média. * $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle e # $p \leq 0,05$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparados camundongos WT com *Socs2*^{-/-}, avaliados por teste t de Student.

RANKL e LPS atuam como mediadores de sinalização para a diferenciação de osteoclastos (XU; TEITELBAUM, 2013). Os efeitos da ausência de *Socs2* na osteoclastogênese foram avaliados pela análise das proteínas TRAF6, CASPASE 3, c-FOS e NFATc1. Como mostrado na Figura 25, os níveis de expressão das proteínas TRAF6, c-FOS, CASPASE 3, NFATc1 aumentaram após estímulo com RANKL e AaLPS. A ausência de SOCS2 está associada a níveis basais aumentados de TRAF6 e c-FOS, que diminuíram após a estimulação com RANKL e AaLPS. Da mesma forma, na ausência de *Socs2* foram observados níveis constantes de CASPASE 3, após estímulo com RANKL e AaLPS. Assim, embora a produção de

NFATc1 intracelular tenha sido reduzida nas células deficientes para *Socs2*^{-/-}, essa redução não afetou a osteoclastogênese nessas células.

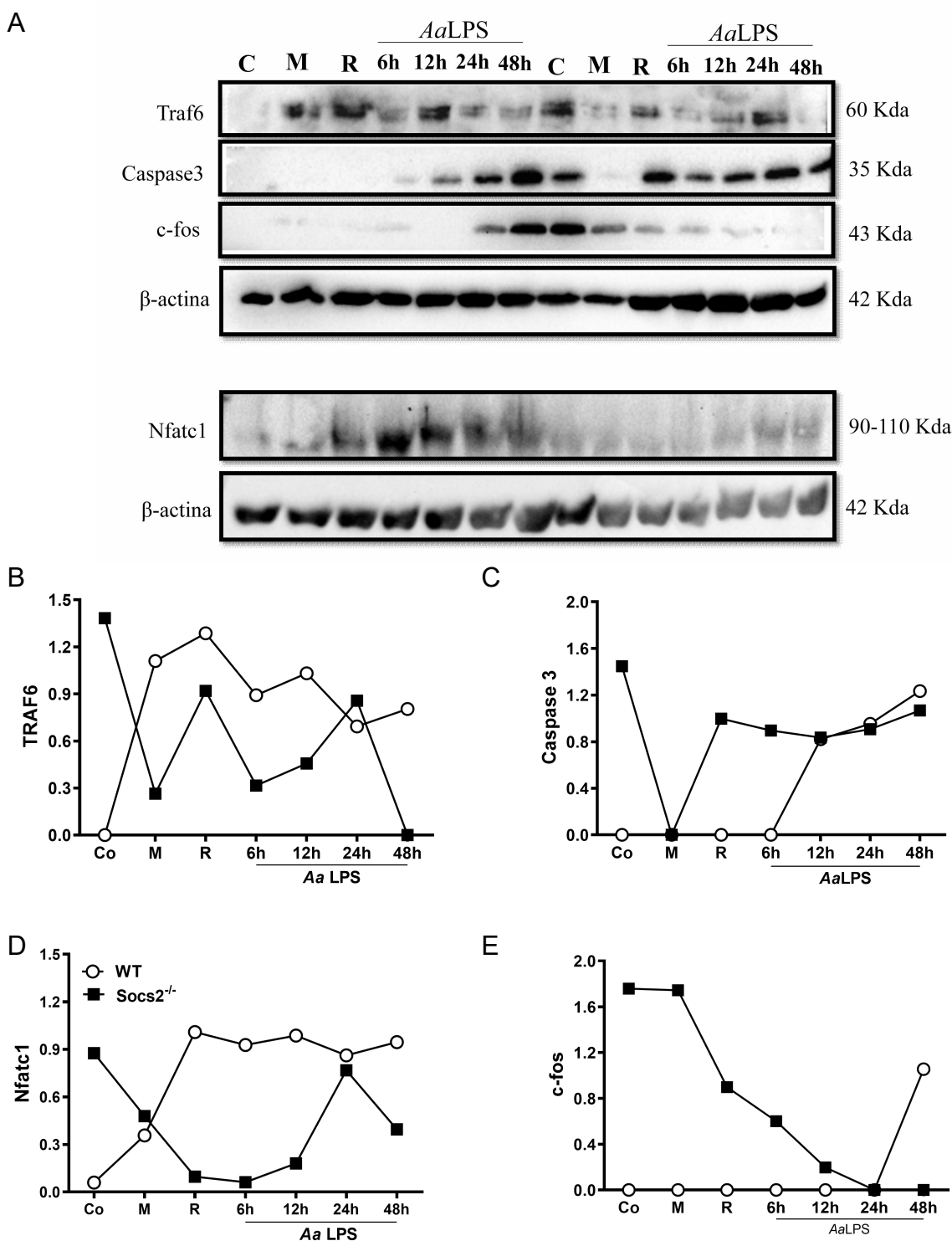
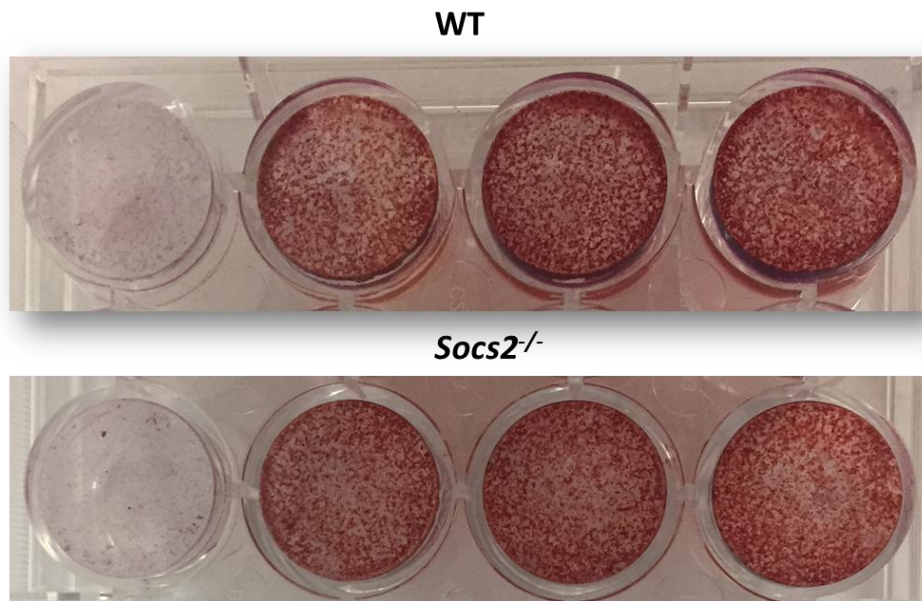


FIGURA 25. Expressão e determinação da expressão proteica de TRAF6, CASPASE3, c-FOS, NFATc1 e β-ACTINA em osteoclastos. Cultura de células da medula óssea provenientes de animais WT e *Socs2*^{-/-} sem estímulo, estimulados com M-CSF (30ng/mL), RANKL (50ng/mL) e LPS-Aa (1,25 ng/mL) coletadas após 6, 12,24 e 48 horas de cultivo. As células foram submetidas à avaliação da expressão proteica de TRAF6, CASPASE3, c-FOS, NFATc1 e B-ACTINA por Western blotting (A). As células foram submetidas a avaliação da expressão proteica de TRAF6 (B), CASPASE3 (B), c-FOS (D), NFATc1 (E) por Western blotting. Os valores são em relação à expressão do gene endógeno β-ACTINA.

4.2.6 SOCS2 não interfere na atividade de osteoblastos *in vitro*

Para verificar se a deficiência de SOCS2 prejudicaria também o processo de formação óssea, células indiferenciadas da medula óssea do fêmur e tíbia foram cultivadas na presença de meio osteogênico durante 21 dias, para diferenciação em osteoblastos. Após esse período, a cultura de células foi tratada com vermelho de Alizarina 2%, que cora matriz extracelular rica em cálcio, identificando, portanto, depósitos de cálcio em áreas de matriz mineralizada. A proporção de áreas marcadas com vermelho de alizarina foi determinada por imagens macroscópicas das culturas. Os resultados mostram um padrão semelhante de deposição de cálcio em células provenientes de camundongos WT e *Socs2*^{-/-} (Fig. 26A). Em seguida esses nódulos foram diluídos e os valores de absorbância foram mensurados. Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos (Fig. 26B).

A



B

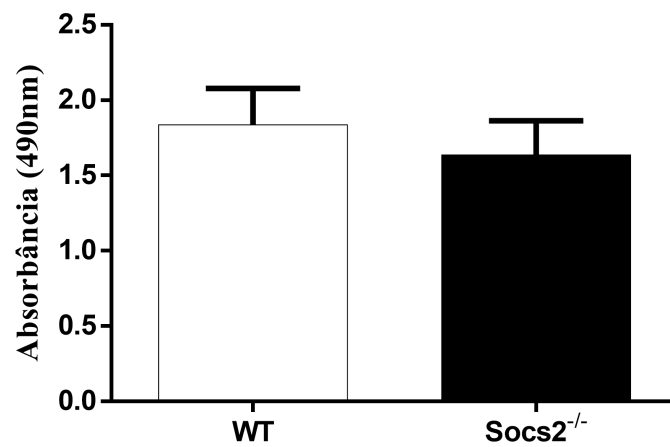


FIGURA 26. Aspecto macroscópico e valores de absorbância após diluição dos grânulos corados com vermelho de alizarina a 2% de culturas de células osteoblásticas provenientes de animais WT e *Socs2*^{-/-}. Imagens representativas após a coloração com vermelho de alizarina 2% em cultura de osteoblastos provenientes da medula óssea de camundongos WT e *Socs2*^{-/-}, após 21 dias de tratamento com meio mineralizante (A). Os grânulos de alizarina foram diluídos, e em seguida, foi medido os valores de absorbância do sobrenadante em culturas de osteoblastos de camundongos WT e *Socs2*^{-/-} (B). A barra indica média \pm desvio padrão da média. Não houve diferença estatística conforme avaliado por teste t de *Student*.

5

Discussão

5 DISCUSSÃO

A perda óssea alveolar durante a doença periodontal é modulada pela interação entre as células ósseas e as células do sistema imunológico (ZHOU et al., 2020), desse modo, moléculas de sinalização, como as citocinas, são importantes participantes desse processo (ALVAREZ et al., 2019). Tendo em vista o potencial papel de SOCS2 na regulação da rede de citocinas e de várias outras vias de sinalização celulares e, conseqüentemente, um possível papel na remodelação óssea, foi realizada uma análise do osso maxilar em estado fisiológico ou infeccioso, utilizando-se camundongos deficientes para SOCS2.

O equilíbrio entre citocinas pró- e anti-inflamatórias e suas moléculas reguladoras têm sido sugerido como essencial para proteção contra a destruição dos tecidos periodontais (SILVA et al., 2007). Além de serem reguladas por mediadores anti-inflamatórios, sua atividade está sob o controle das proteínas SOCS, que regulam negativamente a transdução de sinal como parte de um *feedback* inibitório (GARLET et al., 2006). A produção de SOCS1, SOCS2 e SOCS3 é induzida por uma ampla variedade de citocinas (YOSHIMURA; NAKA; KUBO, 2007). Em relação à doença periodontal, já foi demonstrado que pacientes com gengivite ou periodontite exibiram níveis significativamente mais altos de expressão de RNA mensageiro para *Socs1*, *Socs2* e *Socs3*, em comparação a pacientes saudáveis. Além disso, a expressão de RNA mensageiro para *Socs1* e *Socs3* foi maior em pacientes com periodontite do que em pacientes com gengivite. O nível de expressão do RNA mensageiro para *Socs2* foi semelhante entre os dois grupos (GARLET et al., 2006).

Já é conhecido que SOCS2 regula o crescimento pós-natal e sua deficiência, em camundongos, causa gigantismo com aumento do comprimento ósseo, aumento proporcional nos músculos esqueléticos e da maioria dos órgãos, associado a uma desregulação da via de sinalização do hormônio do crescimento (GH)/fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I) (METCALF et al., 2000). No entanto, já foi demonstrado que a ausência de SOCS2 resultou também na redução da densidade mineral óssea trabecular e cortical volumétrica no fêmur e na tíbia de camundongos *Socs2*^{-/-}, e esse efeito não é consistente com um aumento esperado na sinalização de GH/IGF-I nesses camundongos, sendo que o mecanismo por trás

da redução da densidade mineral ainda não foi elucidado (LORENTZON et al., 2005). Foi observado, no presente estudo, parâmetros ósseos de osteopenia nos maxilares de camundongos *Socs2*^{-/-}, como a diminuição da densidade óssea mineral (BMD), do volume ósseo (BV), do volume trabecular ósseo (BV/TV), da espessura trabecular (Tb. Th) e do número de trabéculas (Tb. N), bem como níveis basais aumentados de osteoclastos nos tecidos periodontais, confirmando que SOCS2 é importante para a regulação da remodelação óssea durante o crescimento esquelético.

A inoculação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) na cavidade bucal de camundongos induz perda óssea alveolar (MADEIRA et al., 2013b); desse modo, este estudo avaliou se a ausência de *Socs2* poderia influenciar na reabsorção do osso alveolar induzida por *Aa*. A análise da perda óssea alveolar é um marcador da doença periodontal associada à inoculação de *Aa* nos tecidos periodontais de camundongos, mostrando a efetividade do estabelecimento do modelo de doença periodontal experimental. Comparativamente aos camundongos WT, os camundongos *Socs2*^{-/-} infectados com *Aa* mostraram pronunciada reabsorção óssea alveolar do osso maxilar. Esse fenótipo foi associado ao aumento da contagem de células TRAP-positivas no osso alveolar. Além disso, *in vitro*, as células derivadas da medula óssea de camundongos *Socs2*^{-/-} exibiram maior diferenciação em osteoclastos. Curiosamente, a ausência de SOCS2 foi associada à diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, normalmente associadas ao aumento da reabsorção óssea alveolar. Acreditamos que níveis basais aumentados de osteoclastos resultaram nas características osteopênicas observadas nas maxilas de camundongos deficientes de *Socs2*, o que pode ter favorecido uma maior perda óssea alveolar após desafio com *Aa* e um fator importante na redução da densidade mineral óssea que foi observada nestes camundongos.

As proteínas SOCS geralmente estão ausentes ou são minimamente expressas em tecidos periodontais saudáveis (GARLET et al., 2006). A regulação positiva e expressão diferencial em tecidos inflamados é um mecanismo regulatório importante, que pode influenciar o resultado de uma reação inflamatória. Um estudo mostrou que SOCS1 e SOCS3 foram correlacionados com a regulação da inflamação em tecidos periodontais de ratos com periodontite induzida por ligadura (DE SOUZA et al., 2011), e outro estudo mostrou que camundongos *Socs3*^{-/-}

apresentaram aumento da perda óssea alveolar, aumento do número de osteoclastos e aumento da expressão de RANKL após infecção por *Porphyromonas gingivalis* (CHAVES DE SOUZA et al., 2013). Além disso, níveis aumentados de SOCS2 foram obtidos em tecidos gengivais de pacientes com gengivite ou periodontite crônica, níveis estes que podem estar envolvidos na regulação negativa de citocinas inflamatórias e sinalização de TLRs, atenuando, portanto, a reação inflamatória e a gravidade da doença periodontal (GARLET et al., 2006). Os dados do presente estudo também confirmaram que há expressão de *Socs2* (embora não significativa) após a infecção com *Aa* e que *Socs2* é expresso por osteoclastos. Sendo este o primeiro estudo que correlaciona SOCS2 à perda óssea alveolar.

A inoculação de bactérias patogênicas em tecidos periodontais induz a produção de diversos mediadores inflamatórios (NISHIDA et al., 2001). Dentre eles, as citocinas desempenham um papel importante na resposta inflamatória no tecido periodontal e determinam o grau de destruição tecidual (SILVA et al., 2007). Muitas das citocinas estimuladoras e inibidoras da reabsorção óssea sinalizam pela via JAK/STAT. Fukushima e colaboradores (2010) demonstraram que em células do ligamento periodontal humanas IL-6 e IL-1 β induziram a expressão de *Socs3*, mas não de *Socs2*. Nosso trabalho, avaliou a expressão de moléculas inflamatórias envolvidas na remodelação óssea, além de IL-6 e IL-1 β , como TNF, IFN- γ , IL-10, TGF- β e IL-17. Curiosamente, apesar do aumento da perda óssea alveolar observada na ausência de SOCS2, foi observada uma diminuição da produção de TNF e IL-6 em camundongos deficientes para SOCS2 e também por fibroblastos derivados de camundongos *Socs2*^{-/-}. O que está de acordo com estudos anteriores do nosso grupo de estudo que mostraram que a produção de TNF (BRANT et al., 2016; ESPER et al., 2012) e IL-6 (ESPER et al., 2012) é substancialmente diminuída na ausência de SOCS2, após infecção com *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium berghei* Anka. A produção de IL-10, IL-1 β , IL-17 e IFN- γ também foi menor em fibroblastos derivados de camundongos *Socs2*^{-/-}.

Em relação à LXA₄, um mediador anti-inflamatório e pró-resolutivo, observou-se aumento da produção em camundongos *Socs2*^{-/-} após 30 e 60 dias de infecção, o que está de acordo com os resultados obtidos por Esper et al. (2012). Esse aumento pode representar um mecanismo compensatório em resposta à perda óssea alveolar aumentada, uma vez que dados na literatura mostram que SOCS2 é um mediador

intracelular crucial das ações anti-inflamatórias de LXA₄ (MACHADO et al., 2006). Recentemente, estudos têm demonstrado que a LXA₄ pode inibir a formação e função dos osteoclastos por meio da modulação de diferentes vias (ALI et al., 2020). LXA₄, por exemplo, reduziu a quantidade de perda óssea induzida após ovariectomia e que esses efeitos protetores estão associados à inibição do NF-κB, AP-1, PI3K-AKT, p-38, ERK e JNK, além da redução dos níveis de RANKL/OPG, TNF, IL-1β e IL-6 (CUI et al., 2018). Os resultados do presente estudo indicam que SOCS2 desempenha um papel importante no controle da perda óssea alveolar na doença periodontal experimental induzida por Aa, e esse mecanismo parece não estar relacionado ao controle da inflamação.

A perda óssea alveolar que ocorre durante a doença periodontal é dependente da produção de RANKL por osteoblastos e células do ligamento periodontal (ZHOU et al., 2020). Este evento é regulado pelo receptor *decoy* OPG, que inibe a ação de RANKL na reabsorção óssea (ZHOU et al., 2020). Inconsistente com o fenótipo observado em camundongos *Socs2*^{-/-} infectados com Aa, não foi observado aumento na razão RANKL/OPG. Curiosamente, níveis reduzidos de RANKL foram produzidos por fibroblastos derivados de camundongos *Socs2*^{-/-}. Embora RANKL solúvel, produzido por células B e T ativadas, ter um importante papel na perda óssea alveolar (KANZAKI et al., 2016), o RANKL em sua forma ligada à membrana tem sido descrito como a principal forma funcional dessa citocina (TAKAHASHI et al., 1988). Tsukasaki e colaboradores (2018) exploraram o papel de RANKL solúvel na doença periodontal, utilizando animais que não apresentavam a forma solúvel de RANKL e observaram que não houve diferença na perda óssea alveolar nesses animais, em relação aos animais que apresentavam tanto a forma solúvel quanto à forma ligada à membrana, demonstrando que a contribuição de RANKL solúvel foi negligenciável (TSUKASAKI et al., 2018). Desse modo, também já foi descrito que os neutrófilos podem induzir diretamente a reabsorção óssea, pois expressam RANKL ligado à membrana. Os neutrófilos estão entre as células imunes mais abundantes nos tecidos periodontais e é o leucócito mais recrutado para o sulco subgengival (ZHOU et al., 2020). A ausência de SOCS2 resultou em um maior infiltrado de neutrófilos, mas nenhuma diferença foi observada na expressão de RANKL de membrana entre neutrófilos de camundongos WT e *Socs2*^{-/-}. Os neutrófilos *Socs2*^{-/-} produziram níveis mais elevados de TNF do que os neutrófilos

WT *in vitro*. Esses resultados sugerem que os efeitos de SOCS2 no osso não são, pelo menos em parte, mediados via RANKL solúvel. Assim, em relação aos nossos resultados, embora os animais *Socs2*^{-/-} não apresentem diferença na quantidade de RANKL solúvel ou na expressão de RANKL na membrana de neutrófilos, eles podem apresentar alterações em outras células não analisadas em nosso estudo, produzindo RANKL que podem interagir diretamente com precursores de osteoclastos pelo contato célula a célula. Outra explicação seria uma maior sensibilidade do receptor RANK nas células deficientes em *Socs2*^{-/-} que dispensaria aumentos consideráveis na expressão de seus ligantes.

A reabsorção óssea é relacionada a uma maior diferenciação e atividade dos osteoclastos (CHAVES DE SOUZA et al., 2013). Os dados *in vitro* revelaram que, na ausência de SOCS2, a capacidade de diferenciação de BMC em osteoclastos é aumentada, indicando um efeito inibidor desta proteína na osteoclastogênese. Além disso, marcadores osteoclásticos específicos, como Catepsina K e RANK, foram semelhantes entre os grupos. Como a remodelação óssea é resultado da função acoplada de osteoclastos e osteoblastos, foi avaliado se a deficiência de SOCS2 também modificaria a função de osteoblastos. Os experimentos *in vitro* mostraram uma produção semelhante de matriz óssea mineralizada por osteoblastos provenientes de BMC de camundongos WT ou *Socs2*^{-/-}. O que pode sugerir que a maior perda óssea alveolar, observada em camundongos *Socs2*^{-/-}, deve-se a um maior número de osteoclastos e não a uma falha na função dos osteoblastos.

Além disso, RANKL pode induzir a expressão de *Socs1* e *Socs3* em células progenitoras de osteoclastos, revertendo os efeitos inibitórios do IFN tipo I na osteoclastogênese (HAYASHI et al., 2002b). Uma vez que as proteínas SOCS podem ter regulação recíproca, devido à sua atividade ubiquitina E3 ligase (HAYASHI et al., 2002b) e que já foi demonstrado que SOCS2 possui a capacidade de antagonizar outros membros da família SOCS (DIF et al., 2001), foi avaliada a expressão de *Socs1* e *Socs3* em osteoclastos derivados de camundongos WT ou *Socs2*^{-/-}. Em linha com estes resultados, foi observada uma expressão aumentada de *Socs1* em osteoclastos deficientes para *Socs2*^{-/-}. Consequentemente, a ausência de SOCS2 resultou na diminuição da produção de TNF e IL-6 por essas células. Tomados em conjunto, esses achados indicam que os osteoclastos participam da disponibilidade de citocinas e que o aumento da expressão de *Socs1* é importante

para coordenar a função dessas células, podendo representar um mecanismo compensatório em resposta à ausência de SOCS2.

Várias moléculas já foram identificadas como mediadores *downstream* da sinalização RANK/RANKL, em células precursoras de osteoclastos (LEIBBRANDT; PENNINGER, 2008). Entre eles estão TRAF6, NF- κ B, MAPK e AP-1 (LOMAGA et al., 1999). O recrutamento de TRAF6 medeia as cascatas de sinalização *downstream*, após interações RANKL-RANK e representa a principal molécula adaptadora, ligando RANK à osteoclastogênese (WALSH; LEE; CHOI, 2015). TNF induz TRAF2, que pode estimular ainda mais a osteoclastogênese induzida por TRAF6 (KITAURA et al., 2013). Particularmente, as proteínas da família SOCS ligam-se ao TRAF6 levando à inibição de várias vias de sinalização de TRAF6 em células estromais e imunes. SOCS2 induz a degradação de TRAF6 dependente de proteassoma pela via dependente de LxA4/AhR/SOCS2 (MCBERRY et al., 2012b). SOCS1 inibe a via de sinalização TLR4-TRAF6 (LIU et al., 2017) e SOCS3 inibe a transdução de sinal de IL-1 β ao inibir a ubiquitinação de TRAF6 (FROBØSE et al., 2006). Além disso, SOCS1 e SOCS3 interagem diretamente com TRAF6 e leva à sua degradação, via poliubiquitinação em células acinares, após estímulo com LPS (ZHOU et al., 2015). No entanto, o envolvimento de SOCS e TRAF6 na via de sinalização RANKL-RANK, em osteoclastos, é pouco elucidada. Nesse estudo foram observados níveis semelhantes de expressão de mRNA de TRAF6 em células precursoras de osteoclastos derivadas de camundongos WT e *Socs2*^{-/-}. Porém, a ausência de SOCS2 mostrou um aumento na expressão basal da proteína TRAF6, que diminuiu após estímulo com RANKL e A α LPS.

Além disso, as LXs ativam AhR e essa ativação desencadeia a expressão de SOCS2, que atua como um mediador intracelular crucial das ações anti-inflamatórias das LXs induzidas por aspirina, *in vivo* (MACHADO et al., 2006). Têm sido demonstrado que AhR é um regulador positivo da osteoclastogênese, *in vitro*, desempenhando um papel crítico na via RANKL (YU et al., 2014). No entanto, expressão semelhante de mRNA de AhR foi observada em ambos os grupos. Em adição, foi demonstrado que caspase 3 está presente em osteoclastos, que sua atividade é necessária para a diferenciação induzida por RANKL, mas que não está envolvida na apoptose dessas células (SZYMCZYK et al., 2006). Neste estudo, a ausência de SOCS2 foi associada a níveis constantes de expressão de caspase 3,

mesmo após estímulo com RANKL e AaLPS, demonstrando que caspase 3 pode desempenhar um papel importante durante o processo de osteoclastogênese independente de SOCS2.

Acredita-se que os fatores *downstream* da sinalização RANKL/RANK influenciam a diferenciação de osteoclastos por meio de seus efeitos em um fator de transcrição comum: o NFATc1 (YAMASHITA et al., 2007). A osteoclastogênese induzida por TNF e RANKL compartilha uma via intracelular similar (KITAURA et al., 2013). Ambos induzem a diferenciação dos osteoclastos ativando a sinalização de c-Fos e NFATc1 (YAMASHITA et al., 2007). Assim, acreditamos que RANK e receptores de TNF possam estar hiperativados na ausência de SOCS2, dispensando a produção de altos níveis dessas citocinas, mecanismos que precisam ainda ser melhor investigados.

Várias linhas de evidências apontam para um papel crítico do NFATc1 na formação e função dos osteoclastos (PARK et al., 2017; TAKAYANAGI, 2005; YAMASHITA et al., 2007). Neste estudo foi observada uma diminuição dos níveis de NFATc1 na ausência de SOCS2. Os resultados indicam que SOCS2 pode desempenhar um papel importante no controle da osteoclastogênese, mas esse mecanismo não parece estar restrito à via de NFATc1, porém essa observação precisa de mais investigação, uma vez que não há dados suficientes disponíveis na literatura sobre a associação do SOCS2 e NFATc1.

Além disso, c-Fos é necessário para a indução a *downstream* de NFATc1 e antígeno semelhante a Fos 1 (FOSL1), e o eixo de sinalização RANKL/AhR/ c-Fos tem mostrado desempenhar um papel crítico na osteoclastogênese (IZAWA et al., 2016). Foi aqui demonstrado que houve um aumento da expressão basal de c-Fos em células precursoras de osteoclastos, na ausência de SOCS2, e esses níveis diminuíram após estímulo com RANKL e AaLPS. Do mesmo modo que TRAF6, c-Fos foi altamente expresso em células não estimuladas, provenientes de animais deficientes para SOCS2, demonstrando que a ausência dessa proteína por si só, parece acarretar alterações nas vias de sinalização do processo de osteoclastogênese, resultando no fenótipo osteopênico encontrado na maxila nesses animais. Assim, nosso estudo indica que a produção de NFATc1 intracelular foi reduzida nas células *Socs2*^{-/-}, mas não afetou a osteoclastogênese nessas células.

SOCS é induzido por uma variedade de estímulos, incluindo citocinas e ligantes de TLR (IZAWA et al., 2016). As proteínas SOCS podem participar de sinalização cruzada entre receptores e também regular outras vias, como os TLRs (KITAURA et al., 2013). Os TLRs reconhecem estruturas microbianas conservadas e ativam macrófagos e células dendríticas (HUANG et al., 2020). Cada vez mais evidências mostram que as proteínas SOCS têm uma função mais ampla na regulação da sinalização de TLR (HUANG et al., 2020). SOCS2 foi descrito como um inibidor da ativação induzida por TLR em células dendríticas (POSSELT et al., 2011). De fato, foi observado que camundongos *Socs2*^{-/-} apresentaram aumento da expressão de mRNA de TLR4 48 h após o estímulo AaLPS. Porém, nenhuma alteração foi observada na expressão de Myd88, uma importante molécula que suporta a sinalização desse receptor. Este resultado está de acordo com o maior número de osteoclastos neste grupo, inferindo que SOCS2 pode desempenhar um papel importante na osteoclastogênese induzida por AaLPS.

Nossos resultados mostraram que SOCS2 pode desempenhar um papel importante no controle da perda óssea alveolar na doença periodontal experimental induzida por Aa, mas este mecanismo não parece estar relacionado ao controle da inflamação, como geralmente acontece na ausência de outros membros da família SOCS. Porém, pode estar relacionado a um papel direto de SOCS2 na atividade dos osteoclastos. Além disso, a presença de alterações fisiológicas em camundongos *Socs2*^{-/-}, como aumento do número de osteoclastos e aumento da expressão de moléculas importantes na osteoclastogênese, parecem ser responsáveis pela redução da densidade mineral óssea observada nesses camundongos, pontuando um papel direto do SOCS2 no processo de remodelação óssea. Essas descobertas fornecem uma justificativa para o desenvolvimento de novas terapêuticas para reduzir o dano ósseo centrado na redução da formação de osteoclastos em condições de reabsorção óssea.

6 Conclusão

6 CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que houve expressão de SOCS2 após infecção com *Aa* nos tecidos periodontais de camundongos WT e que animais deficientes para essa proteína apresentam perda óssea significativamente maior que animais WT. Além disso, observamos que a ausência de SOCS2 leva a uma maior diferenciação de osteoclastos *in vitro*. Porém, tanto a diferenciação de osteoclastos, quanto a maior perda óssea observada *in vivo* não são acompanhadas por uma maior produção de citocinas inflamatórias, o que nos leva a considerar um papel direto de SOCS2 na atividade de osteoclastos, interferindo no desenvolvimento e progressão do processo de reabsorção óssea alveolar durante a patogênese da doença periodontal.

Os dados do presente trabalho sugerem que SOCS2 pode potencialmente regular eventos de sinalização envolvidos na diferenciação e ativação de osteoclastos o que, conseqüentemente, pode interferir no curso da doença periodontal, pontuando para um papel promissor de SOCS2 como um alvo terapêutico para uma interferência clínica nesse processo.

Referências

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, T. et al. Osteoblast differentiation is impaired in SOCS-1-deficient mice. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, 2006.
- ALEXANDER, W. S.; HILTON, D. J. T. Role of Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) Proteins in Regulation of the Immune Response. **Annual Review of Immunology**, 2004.
- ALI, M. et al. The effect of lipoxin A4 on E. coli LPS-induced osteoclastogenesis. **Clinical Oral Investigations**, 2020.
- ALVAREZ, C. et al. **Osteoimmunology of oral and maxillofacial diseases: Translational applications based on biological mechanisms** *Frontiers in Immunology*, 2019.
- AMBROSIO, N. et al. Detection and quantification of Porphyromonas gingivalis and Aggregatibacter actinomycetemcomitans in bacteremia induced by interdental brushing in periodontally healthy and periodontitis patients. **Archives of Oral Biology**, 2019.
- ANTUNES, J. L. F.; RONCALLI, A. G.; NARVAI, P. C. **A Pesquisa Nacional de Saúde Bucal. (Projeto SBBrasil). Editorial. Revista de saúde pública**, 2013.
- BAEHNI, P. et al. Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. VIII. Detection of leukotoxic activity of a plaque-derived gram-negative microorganism. **Infection and Immunity**, 1979.
- BALASHOVA, N. V. et al. Leukotoxin confers beta-hemolytic activity to Actinobacillus actinomycetemcomitans. **Infection and Immunity**, 2006.
- BALTO, K.; SASAKI, H.; STASHENKO, P. Interleukin-6 deficiency increases inflammatory bone destruction. **Infection and Immunity**, 2001.
- BEHL, Y. et al. Activation of the Acquired Immune Response Reduces Coupled Bone Formation in Response to a Periodontal Pathogen. **The Journal of Immunology**, 2008.
- BORGES, I. et al. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. **Mediators of Inflammation**, 2007.
- BRANT, F. et al. Suppressor of cytokine signaling 2 modulates the immune response profile and development of experimental cerebral malaria. **Brain, Behavior, and Immunity**, 2016.
- BROWN, L. J.; LÖE, H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. **Periodontology 2000**, 1993.
- CARDOSO, C. R. et al. Characterization of CD4 + CD25 + natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. **Journal of Leukocyte Biology**, 2008.
- CHAKRAVARTI, A. et al. Surface RANKL of Toll-like receptor 4-stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. **Blood**, 2009.
- CHANDRASEKHARAN, J. A.; SHARMA-WALI, N. **Lipoxins: Nature's way to resolve inflammation** *Journal of Inflammation Research*, 2015.
- CHAVES DE SOUZA, J. A. et al. SOCS3 expression correlates with severity of inflammation, expression of proinflammatory cytokines, and activation of STAT3 and p38 MAPK in LPS-induced inflammation in vivo. **Mediators of Inflammation**, 2013.
- CHO, D. C. et al. Bone corticalization requires local SOCS3 activity and is promoted by androgen action via interleukin-6. **Nature Communications**, 2017.
- CUI, K. et al. Lipoxin A4 improves erectile dysfunction in rats with type i diabetes by inhibiting oxidative stress and corporal fibrosis. **Asian Journal of Andrology**, 2018.

- D.H., F. et al. How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: A model for infectious diseases. **Periodontology** **2000**, 2006.
- DARNAY, B. G. et al. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF- κ B (RANK): Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF- κ B and c-JUN N-terminal kinase. **Journal of Biological Chemistry**, 1998.
- DARVEAU, R. P. **Periodontitis: A polymicrobial disruption of host homeostasis** **Nature Reviews Microbiology**, 2010.
- DARVEAU, R. P.; HAJISHENGALLIS, G.; CURTIS, M. A. *Porphyromonas gingivalis* as a potential community activist for disease. **Journal of Dental Research**, 2012.
- DE SOUZA, J. A. C. et al. Expression of suppressor of cytokine signaling 1 and 3 in ligature-induced periodontitis in rats. **Archives of Oral Biology**, 2011.
- DENG, L. et al. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. **Cell**, 2000.
- DIF, F. et al. Cytokine-inducible SH2-containing protein suppresses PRL signaling by binding the PRL receptor. **Endocrinology**, 2001.
- EKE, P. I. et al. Prevalence of periodontitis in adults in the united states: 2009 and 2010. **Journal of Dental Research**, 2012.
- EL KEBIR, D. et al. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. **Circulation Research**, 2008.
- ESPER, L. et al. Role of SOCS2 in modulating heart damage and function in a murine model of acute Chagas disease. **American Journal of Pathology**, 2012.
- FOX, S. W. et al. The Possible Role of TGF- β -Induced Suppressors of Cytokine Signaling Expression in Osteoclast/Macrophage Lineage Commitment In Vitro. **The Journal of Immunology**, 2003.
- FROBØSE, H. et al. Suppressor of cytokine signaling-3 inhibits interleukin-1 signaling by targeting the TRAF-6/TAK1 complex. **Molecular Endocrinology**, 2006.
- FUKUSHIMA, A. et al. Pro-inflammatory cytokines induce suppressor of cytokine signaling-3 in human periodontal ligament cells. **Journal of Endodontics**, 2010.
- FUNK, C. D. **Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology** **Science**, 2001.
- GARLET, G. P. et al. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. **Journal of Periodontal Research**, 2003.
- GARLET, G. P. et al. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, 2004.
- GARLET, G. P. et al. Expression of suppressors of cytokine signaling in diseased periodontal tissues: A stop signal for disease progression? **Journal of Periodontal Research**, 2006.
- GARLET, G. P. **Critical reviews in oral biology & medicine: Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: A re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints** **Journal of Dental Research**, 2010.
- GENCO, R. J.; VAN DYKE, T. E. **Reducing the risk of CVD in patients with periodontitis** **Nature Reviews Cardiology**, 2010.
- GRAVES, D. Cytokines That Promote Periodontal Tissue Destruction. **Journal of Periodontology**, 2008.
- GUENTSCH, A. et al. Neutrophils in chronic and aggressive periodontitis in interaction with *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Journal of Periodontal Research**, 2009.
- HAJISHENGALLIS, E.; HAJISHENGALLIS, G. **Neutrophil homeostasis and periodontal health in**

- children and adults **Journal of Dental Research**, 2014.
- HAUBEK, D. et al. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. **The Lancet**, 2008.
- HAYASHI, T. et al. Regulation of receptor activator of NF- κ B ligand-induced osteoclastogenesis by endogenous interferon- β (INF- β) and suppressors of cytokine signaling (SOCS). The possible counteracting role of SOCSs in IFN- β -inhibited osteoclast formation. **Journal of Biological Chemistry**, 2002a.
- HAYASHI, T. et al. Regulation of receptor activator of NF- κ B ligand-induced osteoclastogenesis by endogenous interferon- β (INF- β) and suppressors of cytokine signaling (SOCS). The possible counteracting role of SOCSs in IFN- β -inhibited osteoclast formation. **Journal of Biological Chemistry**, 2002b.
- HENDERSON, B. et al. **Molecular Pathogenicity of the Oral Opportunistic Pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*** **Annual Review of Microbiology**, 2003.
- HORVAT, S.; MEDRANO, J. F. Lack of *Socs2* expression causes the high-growth phenotype in mice. **Genomics**, 2001.
- HUANG, S. et al. **SOCS Proteins Participate in the Regulation of Innate Immune Response Caused by Viruses** **Frontiers in Immunology**, 2020.
- INAGAKI-OHARA, K.; YOSHIMURA, A. SOCS, inflammation and metabolism. **Journal of Molecular Biochemistry**, 2014.
- INOUE, J. ICHIRO et al. **Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: Adapter proteins that mediate cytokine signaling** **Experimental Cell Research**, 2000.
- IZAWA, T. et al. The Nuclear Receptor AhR Controls Bone Homeostasis by Regulating Osteoclast Differentiation via the RANK/c-Fos Signaling Axis. **The Journal of Immunology**, 2016.
- KAMIZONO, S. et al. The SOCS Box of SOCS-1 Accelerates Ubiquitin-dependent Proteolysis of TEL-JAK2. **Journal of Biological Chemistry**, 2001.
- KANZAKI, H. et al. Soluble RANKL Cleaved from Activated Lymphocytes by TNF- α -Converting Enzyme Contributes to Osteoclastogenesis in Periodontitis. **The Journal of Immunology**, 2016.
- KEBSCHULL, M.; DEMMER, R. T.; PAPAPANOU, P. N. "Gum bug, leave my heart alone!"-epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. **Journal of Dental Research**, 2010.
- KELK, P. et al. Cellular and molecular response of human macrophages exposed to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin. **Cell Death and Disease**, 2011.
- KIKKERT, R. et al. Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. **Oral Microbiology and Immunology**, 2007.
- KINANE, D. F.; STATHOPOULOU, P. G.; PAPAPANOU, P. N. **Periodontal diseases** **Nature Reviews Disease Primers**, 2017.
- KITAURA, H. et al. **Immunological reaction in TNF- α -mediated osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo** **Clinical and Developmental Immunology**, 2013.
- LALLA, E.; PAPAPANOU, P. N. **Diabetes mellitus and periodontitis: A tale of two common interrelated diseases** **Nature Reviews Endocrinology**, 2011.
- LEIBBRANDT, A.; PENNINGER, J. M. **RANK/RANKL: Regulators of immune responses and bone physiology** **Annals of the New York Academy of Sciences**, 2008.
- LETELLIER, E.; HAAN, S. **SOCS2: Physiological and pathological functions** **Frontiers in Bioscience - Elite**, 2016.
- LIAU, N. P. D. et al. The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1. **Nature Communications**,

2018.

LIU, A. et al. Ischemic preconditioning protects against liver ischemia/reperfusion injury via heme oxygenase-1-mediated autophagy. **Critical Care Medicine**, 2014.

LIU, S. ZHI et al. Ischemic Preconditioning-Induced SOCS-1 Protects Rat Intestinal Ischemia Reperfusion Injury via Degradation of TRAF6. **Digestive Diseases and Sciences**, 2017.

LIU, Y. C. G.; LERNER, U. H.; TENG, Y. T. A. Cytokine responses against periodontal infection: Protective and destructive roles. **Periodontology 2000**, 2010.

LOMAGA, M. A. et al. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. **Genes and Development**, 1999.

LORENTZON, M. et al. Reduced bone mineral density in SOCS-2-deficient mice. **Pediatric Research**, 2005.

LUNDBERG, K. et al. **Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection** *Nature Reviews Rheumatology*, 2010.

MACHADO, F. S. et al. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. **Nature Medicine**, 2006.

MADEIRA, M. F. M. et al. Mif induces osteoclast differentiation and contributes to progression of periodontal disease in mice. **Microbes and Infection**, 2012.

MADEIRA, M. F. M. et al. MyD88 is essential for alveolar bone loss induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide in mice. **Molecular Oral Microbiology**, 2013a.

MADEIRA, M. F. M. et al. Platelet-activating factor receptor blockade ameliorates *aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease in Mice. **Infection and Immunity**, 2013b.

MADIANOS, P. N.; BOBETSIS, Y. A.; OFFENBACHER, S. **Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease: Pathogenic mechanisms** *Journal of Clinical Periodontology*, 2013.

MAEKAWA, T. et al. *Porphyromonas gingivalis* manipulates complement and TLR signaling to uncouple bacterial clearance from inflammation and promote dysbiosis. **Cell Host and Microbe**, 2014.

MANGAN, D. F. et al. Lethal effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human T lymphocytes. **Infection and Immunity**, 1991.

MARK BARTOLD, P.; VAN DYKE, T. E. **Host modulation: controlling the inflammation to control the infection** *Periodontology 2000*, 2017.

MCBERRY, C. et al. SOCS2-induced proteasome-dependent TRAF6 degradation: A common anti-inflammatory pathway for control of innate immune responses. **PLoS ONE**, 2012a.

MCBERRY, C. et al. SOCS2-induced proteasome-dependent TRAF6 degradation: A common anti-inflammatory pathway for control of innate immune responses. **PLoS ONE**, 2012b.

METCALF, D. et al. Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. **Nature**, 2000.

MORALES, O. et al. $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ inhibits GH-induced expression of SOCS-3 and CIS and prolongs growth hormone signaling via the Janus kinase (JAK2)/signal transducers and activators of transcription (STAT5) system in osteoblast-like cells. **Journal of Biological Chemistry**, 2002.

MURPHY, K. M.; REINER, S. L. **The lineage decisions of helper T cells** *Nature Reviews Immunology*, 2002.

NISHIDA, E. et al. Bone resorption and local interleukin-1 α and interleukin-1 β synthesis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. **Journal of Periodontal Research**, 2001.

PAPATHANASIOU, E. et al. SOCS-3 Regulates Alveolar Bone Loss in Experimental Periodontitis. **Journal of Dental Research**, 2016.

PARK, K. H. et al. *Pueraria lobata* Inhibits RANKL-Mediated Osteoclastogenesis Via Downregulation

- of CREB/PGC1 β /c-Fos/NFATc1 Signaling. **American Journal of Chinese Medicine**, 2017.
- PELLETIER, M. et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. **Blood**, 2010.
- POSSELT, G. et al. Suppressor of Cytokine Signaling 2 Is a Feedback Inhibitor of TLR-Induced Activation in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, 2011.
- QUEIROZ-JUNIOR, C. et al. A controversial role for IL-12 in immune response and bone resorption at apical periodontal sites. **Clinical and Developmental Immunology**, 2011.
- RAKESH, K.; AGRAWAL, D. K. Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors. **Biochemical Pharmacology**, 2005.
- RICO-BAUTISTA, E.; FLORES-MORALES, A.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, L. **Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 2, a protein with multiple functions** *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2006.
- SAINT-GERMAIN, E. et al. Phosphorylation of SOCS1 inhibits the SOCS1-p53 tumor suppressor axis. **Cancer Research**, 2019.
- SANZ, M. et al. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, 2017.
- SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. **Resolving inflammation: Dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators** *Nature Reviews Immunology*, 2008.
- SILVA, T. A. et al. **Chemokines in oral inflammatory diseases: Apical periodontitis and periodontal disease** *Journal of Dental Research*, 2007.
- SIMS, N. A.; VRAHNAS, C. **Regulation of cortical and trabecular bone mass by communication between osteoblasts, osteocytes and osteoclasts** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2014.
- SZYMCZYK, K. H. et al. Active caspase-3 is required for osteoclast differentiation. **Journal of Cellular Physiology**, 2006.
- TAICHMAN, N. S.; DEAN, R. T.; SANDERSON, C. J. Biochemical and morphological characterization of the killing of human monocytes by a leukotoxin derived from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infection and Immunity**, 1980.
- TAKAHASHI, N. et al. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. **Endocrinology**, 1988.
- TAKAYANAGI, H. et al. RANKL maintains bone homeostasis through c-fos-dependent induction of interferon- β . **Nature**, 2002.
- TAKAYANAGI, H. **Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology** *Journal of Molecular Medicine*, 2005.
- TANNAHILL, G. M. et al. SOCS2 Can Enhance Interleukin-2 (IL-2) and IL-3 Signaling by Accelerating SOCS3 Degradation. **Molecular and Cellular Biology**, 2005.
- TAUBMAN, M. A. et al. Periodontal bacterial DNA suppresses the immune response to mutans streptococcal glucosyltransferase. **Infection and Immunity**, 2007.
- TSUKASAKI, M. et al. Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells. **Nature Communications**, 2018.
- VAN DYKE, T. E. et al. Proresolving nanomedicines activate bone regeneration in periodontitis. **Journal of Dental Research**, 2015.
- VAN DYKEN, T. E. **Proresolving lipid mediators: Potential for prevention and treatment of periodontitis**. *Journal of Clinical Periodontology*. **Anais...**2011
- VENKETARAMAN, V. et al. Both leukotoxin and poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide

- protect *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cells from macrophage killing. **Microbial Pathogenesis**, 2008.
- WADE, W. G. **Has the use of molecular methods for the characterization of the human oral microbiome changed our understanding of the role of bacteria in the pathogenesis of periodontal disease?** *Journal of Clinical Periodontology*. **Anais...**2011
- WAGNER, E. F.; EFERL, R. **Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system***Immunological Reviews*, 2005.
- WALKER, E. C. et al. Cortical bone maturation in mice requires SOCS3 suppression of gp130/STAT3 signalling in osteocytes. **eLife**, v. 9, p. 1–27, 2020.
- WALSH, M. C.; LEE, J.; CHOI, Y. Tumor necrosis factor receptor- associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system. **Immunological Reviews**, 2015.
- WONG, P. K. K. et al. SOCS-3 negatively regulates innate and adaptive immune mechanisms in acute IL-1-dependent inflammatory arthritis. **Journal of Clinical Investigation**, 2006.
- XU, F.; TEITELBAUM, S. L. **Osteoclasts: New Insights***Bone Research*, 2013.
- YAMASHITA, T. et al. NF- κ B p50 and p52 regulate receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and tumor necrosis factor-induced osteoclast precursor differentiation by activating c-Fos and NFATc1. **Journal of Biological Chemistry**, 2007.
- YAN, C. et al. Suppressor of cytokine signaling 3 inhibits LPS-induced IL-6 expression in osteoblasts by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein. **Journal of Biological Chemistry**, 2010.
- YANAGITA, M. et al. IL-15 up-regulates iNOS expression and NO production by gingival epithelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2002.
- YIN, Y.; LIU, W.; DAI, Y. **SOCS3 and its role in associated diseases***Human Immunology*, 2015.
- YOSHIMURA, A.; NAKA, T.; KUBO, M. **SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation***Nature Reviews Immunology*, 2007.
- YU, H. et al. SOCS3 deficiency in myeloid cells promotes tumor development: Involvement of STAT3 activation and myeloid-derived suppressor cells. **Cancer Immunology Research**, 2015.
- YU, T. Y. et al. Aryl hydrocarbon receptor catabolic activity in bone metabolism is osteoclast dependent in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2014.
- ZHANG, X. et al. Involvement of SOCS3 in regulation of CD11c+ dendritic cell-derived osteoclastogenesis and severe alveolar bone loss. **Infection and Immunity**, 2009.
- ZHOU, A. et al. **Role of Hippo-YAP Signaling in Osseointegration by Regulating Osteogenesis, Angiogenesis, and Osteoimmunology***Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020.
- ZHOU, X. et al. Socs1 and Socs3 degrades Traf6 via polyubiquitination in LPS-induced acute necrotizing pancreatitis. **Cell Death and Disease**, 2015.
- ZOU, W.; BAR-SHAVIT, Z. Dual modulation of osteoclast differentiation by lipopolysaccharide. **Journal of Bone and Mineral Research**, 2002.

Anexo

PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS DA UFMG (CEUA UFMG)



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: [319/2017](#)

Título do projeto: Papel da modulação da resposta imune na doença periodontal experimental em camundongos.

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Mila Fernandes Moreira Madeira

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Microbiologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 13/11/2017. Validade: 13/11/2017 à 12/11/2022

Belo Horizonte, 13/11/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de [Minas Gerais](#)
Avenida [Antônio Carlos, 6627](#) – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@orpa.ufmg.br