



UNICAMP

Faculdade de Odontologia de Piracicaba



Universidade Estadual de Campinas

Tatiana Meulman Leite da Silva

Cirurgiã-dentista

**Avaliação do efeito da inoculação de *Porphyromonas gingivalis*
na progressão da doença periodontal em ratos. Estudo
histológico e imunológico.**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do
Título de Mestre em Clínica Odontológica-
Área de concentração em Periodontia**

Orientador: Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior

Piracicaba

Fevereiro de 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

Si38a	Silva, Tatiana Meulman Leite da. Avaliação do efeito da inoculação de <i>Porphyromonas gingivalis</i> na progressão da doença periodontal em ratos. Estudo histológico e imunológico. / Tatiana Meulman Leite da Silva. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009. Orientador: Francisco Humberto Nociti Júnior. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Periodontia. I. Nociti Júnior, Francisco Humberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)
-------	--

Título em Inglês: *Porphyromonas gingivalis* effect on the progression of periodontal disease in rats. Histologic and immunologic study

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Periodontics

Área de Concentração: Periodontia

Titulação: Mestre em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Márcio Zaffalon Casati, Poliana Mendes Duarte, Francisco Humberto Nociti Júnior

Data da Defesa: 18-02-2009

Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 18 de Fevereiro de 2009, considerou a candidata TATIANA MEULMAN LEITE DA SILVA aprovada.

A handwritten signature in cursive script, likely belonging to Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior.

PROF. DR. FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JÚNIOR

A handwritten signature in cursive script, likely belonging to Prof. Dr. Poliana Mendes Duarte.

PROFa. DRa. POLIANA MENDES DUARTE

A handwritten signature in cursive script, likely belonging to Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati.

PROF. DR. MÁRCIO ZAFFALON CASATI

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

Aos meus pais Jair e Geraldina,
aos meus irmãos Talita e Renato,
ao meu marido Rodrigo pela
compreensão nos momentos
ausentes e pelo apoio constante
desde o início da minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À Deus por tudo que tenho, pela família, marido, amigos, pelas oportunidades concedidos em toda a minha vida.

À Universidade Estadual de Campinas na pessoa do Reitor Prof^o. Dr^o. José Tadeu Jorge, e à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por meio do Diretor Prof^o. Dr^o. Francisco Haiter Neto, pela oportunidade cedida.

À Coordenadoria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa da Coordenadora Prof^o. Dr^a Renata C. Matheus R. Garcia, pela pronta atenção dispensada.

Aos professores da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela positiva participação na minha formação, desde a graduação em odontologia.

Aos examinadores que compuseram a banca de tese, Prof^a. Dr^a. Poliana Mendes Duarte, Prof^o. Dr^o. Márcio Zaffalon Casati e Prof^o. Dr^o. Francisco Humberto Nociti Junior, pela análise, avaliação e colaboração nesse trabalho.

Aos examinadores que compuseram a banca suplente de tese, Prof^o. Dr^o. Sérgio de Toledo e Prof^a. Dr^a. Patrícia Furtado Gonçalves, pela análise e colaboração nesse trabalho.

Ao Prof^o. Dr^o. Francisco Humberto Nociti Junior, pela orientação, pelo auxílio e elaboração nesse trabalho, pela amizade e dedicação empenhada no ensino e na pesquisa, além da contribuição à minha formação profissional.

Ao Prof^o. Dr^o. Reginaldo Bruno Gonçalves, obrigada pelos ensinamentos e por toda a atenção dispensada a esse trabalho.

Aos professores da Área de Periodontia Prof^o. Dr^o. Antonio Wilson Sallum, Prof^o. Dr^o. Enilson Antonio Sallum e Prof^o. Dr^o. Márcio Zaffalon Casati pela amizade, respeito e contribuição preciosa à minha formação.

Aos professores da especialização Jorge, Edwil e Vinícius pela preciosa contribuição para meus conhecimentos clínicos na periodontia e acima de tudo pela amizade.

Ao aluno de doutorado da Microbiologia Rafael Nóbrega Stipp por todo seu empenho, dedicação e ajuda durante a fase laboratorial desse trabalho, sua experiência foi muito importante para o resultado do trabalho e sua boa vontade sempre foi um estímulo para que eu aprendesse mais.

As amigas da Periodontia Eliete, Mariana e Regina que sempre estão dispostas a ajudar e foram muito importantes durante todo o curso de mestrado. A amizade de vocês é muito importante para mim.

As amigas do curso de mestrado da área de Periodontia (em ordem alfabética) Ana Paula, Fernanda Mirella e Mônica pela amizade sincera e ensinamentos trocados. A nossa convivência me proporcionou momentos de muita alegria e amadurecimento pessoal.

Aos amigos e amigas do doutorado (em ordem alfabética) Beatriz, Daniela, Ezymar, Fabrícia, Fernanda, Liana, Mauro, Renato Thaisângela e Wagner pela amizade e troca de experiências ao longo desse tempo.

À Karina, aluna de pós-doutorado que me ensinou muito sobre a parte laboratorial, dividindo seus conhecimentos e experiência.

Ao João e a Daiane que acima de tudo considero como grandes amigos e que ajudaram muito na minha formação, tenho vocês como referência na vida profissional.

À Ana Paula, minha colega de mestrado, minha amiga, companheira de viagem por sempre estar disposta a ajudar e sempre ter uma palavra de incentivo quando eu achava que as coisas não dariam certo.

À Carol, minha amiga do coração, minha irmã aqui em Piracicaba, sem você tudo seria muito mais difícil e a vida teria menos graça. Você é e sempre será muito especial para mim.

As minhas amigas de graduação (em ordem alfabética) Camila, Carol, Fer, Letícia, Mafe, Marina, Tati e Thaís que foram minha família em Piracicaba e sempre serão muito importantes para mim. A saudade dos nossos tempos juntas será eterna.

À minha família, meus pais Jair e Geraldina e aos meus irmãos Talita e Renato, que são a base da minha vida, sem vocês eu não chegaria onde estou hoje e não seria tão feliz. Tenho muito orgulho de fazer parte de uma família maravilhosa como essa.

Ao meu marido Rodrigo que é o maior presente que Deus me deu. Sem você nada seria bom, a vida não teria sentido. Sem seu apoio, compreensão, ânimo para encarar as dificuldades e nunca desistir eu não teria ido tão longe na minha vida profissional. Você é meu maior estímulo.

À CAPES, pelos recursos concedidos para a realização desse trabalho.

À todos que direta ou indiretamente colaboraram com esse trabalho durante esses anos.

meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A periodontite é uma doença multifatorial e os depósitos bacterianos no biofilme dental possuem papel essencial na sua patogênese, sendo que muitas bactérias estão associadas com a periodontite, entre elas a *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*). O objetivo desse estudo foi avaliar a influência da inoculação da bactéria *P. gingivalis* na progressão da doença periodontal (DP) induzida por ligadura em ratos. Quarenta ratos machos Wistar foram divididos em três grupos: 1- Controle (n=10); 2- DP induzida por ligadura (n=15) e 3- DP induzida por ligadura + inoculação de *P. gingivalis* (n=15). Os animais foram sacrificados 15, 21 e 30 dias após a indução da doença e os seguintes parâmetros avaliados: perda óssea alveolar e expressão dos genes interleucina-1 beta (IL-1b), IL-1 receptor antagonista (IL-1ra), IL-6, IL-10, ligante do receptor ativador do fator κ B nuclear (RANKL) e osteoprotegerina (OPG), por meio de técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) em tempo real. Microbiologicamente, reações positivas para o gene 16S permitiram determinar que os grupos 2 e 3 apresentassem componente bacteriano na região dento-gengival, sendo que apenas no grupo 3, em todos os períodos, observou-se a presença de *P. gingivalis*. Histometricamente observou-se significativa perda óssea ($p<0,001$) em ambos os grupos com ligadura, sendo esta, em geral, maior para o grupo 2. Por fim, observou-se que a presença de *P. gingivalis* na região dento-gengival promoveu um aumento dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) de fatores de proteção IL-1ra, IL-10 e OPG no tecido gengival ao redor de ligaduras.

Diante dos limites do estudo, concluiu-se que a presença de *P. gingivalis* pode modular a resposta da DP frente à colocação de ligaduras em ratos favorecendo uma resposta anti-inflamatória.

Palavras-chaves: Doença periodontal, *Porphyromonas gingivalis*, ratos.

ABSTRACT

Periodontal disease is a chronic inflammatory disease resulting in damage to supporting tissues of the teeth including alveolar bone. The etiology of periodontitis is multifactorial and the microorganisms in the biofilm play a main role in its pathogenesis. Several bacterial species are associated with periodontal disease, including *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*). The aim of this study was to evaluate the influence of *P. gingivalis* inoculation in the progression of ligature-induced periodontal disease (DP) in rats. Forty male, Wistar rats were randomly assigned to 3 groups: 1- Control (n=10); 2- DP induced by ligature placement (n=15) e 3-DP induced by ligature placement + *P. gingivalis* inoculation (n=15). The animals were sacrificed at 15, 21 and 30 days after the disease induction and the following parameters evaluated: alveolar bone loss and expression of genes Interleukin-1 beta (IL-1b), IL-1 antagonist receptor (IL-1ra), IL-6, IL-10, receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) e osteoprotegerin (OPG) by polymerase chain reaction real time (PCR real time). Microbiologic analysis, demonstrate that groups 2 and 3 were positive for 16S gene, but only animals from group 3 were positive for *P. gingivalis* in all periods. Histometrically, significant bone loss ($p<0,001$) was observed for the ligated groups, as compared with the ligated one. In addition, statistical analyses showed that bone loss was higher in group 2. Furthermore, gene expression analysis showed that the presence of *P. gingivalis* in the dental-gingival area promoted increase in ribonucleic acid messenger (mRNA) levels of factors IL-1ra, IL-10 e OPG.

Within the limits of the present study, it can be concluded that the presence of *P. gingivalis* may modulate ligature-induced periodontitis progression by means of an increase levels of an anti-inflammatory response.

Keywords: Periodontal disease, *Porphyromonas gingivalis*, rats.

SUMÁRIO

	Página
1- Introdução	1
2- Revisão de Literatura	3
3- Proposição	29
4- Material e Métodos	30
5- Resultados	40
6- Discussão	48
7- Conclusão	57
8- Referências Bibliográficas	58
9- Anexos	80

1. INTRODUÇÃO

A DP é caracterizada por alterações inflamatórias crônicas dos tecidos de sustentação dos órgãos dentais e tem sua etiologia relacionada ao biofilme bacteriano aderido à superfície dental (Genco, 1992). É uma doença multifatorial iniciada por um complexo de espécies bacterianas que interage com os tecidos e as células do hospedeiro causando a liberação de grande conjunto de citocinas inflamatórias, quimiocinas e mediadores, alguns dos quais levam à destruição de estruturas periodontais incluindo os tecidos de suporte dental, o osso alveolar e o ligamento periodontal (Holt & Ebersole, 2007).

No início da colonização essa microbiota é composta de cocos gram-positivos anaeróbios facultativos. Após as primeiras 24 horas o biofilme consiste principalmente em estreptococos e abriga também bastonetes gram-positivos, presentes em pequeno número inicialmente e aumentam gradualmente, podendo superar o número de estreptococos. Também encontramos filamentos gram-positivos, principalmente espécies de *Actinomyces*. Esses cocos e bastonetes gram-positivos possuem receptores de superfície que permitem a aderência subsequente de microrganismos gram-negativos anaeróbios estritos, que têm pouca capacidade de aderir diretamente às superfícies dentais (Lindhe, 1997). No caso da DP o biofilme é formado principalmente por microbiota periodontopatogênica, composta predominantemente por bastonetes gram-negativos anaeróbios estritos, sendo que os bastonetes anaeróbios pigmentados de preto são fortemente associados com DP destrutiva, e o maior patógeno desse grupo é a *P. gingivalis* (van Winkelhoff et al., 1989; Haffajee & Socransky 1994). A maioria das espécies bacterianas encontradas no biofilme subgingival de pacientes com periodontite pode ser encontrada no biofilme de pacientes sem destruição periodontal, entretanto a *P. gingivalis* dificilmente é encontrada em biofilme de pacientes sem periodontite (Slots & Ting 1999, Griffen et al., 1998; van Winkelhoff et al., 2002). Esse fato reforça a hipótese de que esse microrganismo não é um habitante normal da cavidade oral (van Winkelhoff et al., 1996).

Essa destruição das estruturas de sustentação dental é resultado da ação ineficaz do sistema de defesa do hospedeiro em resposta ao acúmulo do biofilme

ou por uma super-resposta do hospedeiro contra os periodontopatógenos. Este processo patogênico pode apresentar diferenças na extensão e severidade e as razões para isso são multifatoriais (Page & Kornman, 1997). Uma resposta imune bem sucedida depende da ativação de células apropriadas. Existem dois tipos de resposta imune: a celular e a humoral. A resposta celular envolve a ativação dos macrófagos e a ativação de células CD4 e CD8 enquanto que a resposta humoral é caracterizada pela produção de anticorpos (Gemmell et al., 1998). Essas respostas também são denominadas de resposta Th1 e Th2 que possuem padrão de secreção de citocinas diferentes entre si. As citocinas da resposta Th1, como o interferon γ (IFN γ), aumentam a habilidade dos macrófagos em destruir patógenos intra e extracelulares. Já na resposta Th2 as citocinas como, por exemplo, IL-4, IL-5, IL-6 são associadas com uma forte resposta alérgica e de produção de anticorpos (Mosmann & Sad 1996). Um equilíbrio local na concentração dessas citocinas é um fator importante para determinar o sucesso da resposta imune (Gemmell et al., 1998).

Em razão da dificuldade em se estudar a patogênese da DP em humanos, os modelos animais têm sido muito utilizados. Os ratos possuem uma semelhança ao homem em relação à anatomia periodontal, desenvolvimento e composição do biofilme bacteriano, histopatologia das lesões periodontais e imunologia básica (Klausen, 1991).

Na tentativa de elucidar a interação que ocorre entre hospedeiro e biofilme dental com auxílio do modelo animal de indução de doença experimental o objetivo desse estudo foi avaliar a influência da inoculação da bactéria *Porphyromonas gingivalis* na progressão da doença periodontal (DP) induzida por ligadura em ratos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiologia e Patogênese da Doença Periodontal

A DP é iniciada e mantida por fatores com origem na microbiota presente no biofilme dental (Kahnberg et al., 1976). Esses microrganismos e seus produtos, em contato com o sulco gengival e no interior da bolsa, constituem o agente etiológico primário e participante extrínseco das doenças inflamatórias gengivais e periodontais (Page & Schroeder, 1976).

Experimentos clássicos têm demonstrado que o acúmulo do biofilme dental causa uma resposta inflamatória dos tecidos gengivais de forma reprodutível (Løe et al., 1965) e que a remoção desse biofilme resulta no desaparecimento dos sinais clínicos da inflamação (Theilade et al., 1966).

Inicialmente foi aceita uma relação direta entre o número total de bactérias e a amplitude do seu efeito patogênico, uma vez que diferenças biológicas relacionadas com a composição do biofilme não eram consideradas. Esta visão do biofilme como uma massa biológica está relacionada com a hipótese da placa inespecífica (Theilade, 1986).

A propensão dos sítios inflamados sofrerem destruição tecidual contínua foi identificada posteriormente como sendo de natureza específica, com observação adicional de que nem toda gengivite evolui invariavelmente para periodontite. Estudos longitudinais têm indicado um risco aumentado para a destruição periodontal nos sítios colonizados por alguns tipos de microrganismos potencialmente patogênicos (Slots, 1976; Tanner, 1979). Esta visão da DP sendo causada por patógenos específicos é conhecida como hipótese da placa específica (Loesche, 1979).

Embora seja aceito que o fator etiológico primário da DP é o biofilme dental, muitas características significativas da doença não podem ser explicadas apenas por substâncias presentes no biofilme. Os mecanismos de defesa do hospedeiro também desempenham papel essencial na patogênese da DP. As substâncias oriundas dos microrganismos presentes no biofilme dental são patogênicas por terem a capacidade de ativar diversos mecanismos de defesa do hospedeiro que

amplificam o dano tecidual. Algumas destas substâncias podem causar injúrias diretas às células e aos tecidos do hospedeiro. Outros componentes microbianos podem ativar o processo inflamatório ou o sistema imune humoral ou celular, o que causa danos ao periodonto. Essa última via é responsável pela maior parte das injúrias periodontais (Page & Kornman, 1997). Os microrganismos presentes no biofilme podem prejudicar os componentes celulares e estruturais do periodonto, através da liberação de produtos proteolíticos e nocivos, deve-se considerar também a invasão microbiana dos tecidos moles. A invasão do epitélio dentogengival por espiroquetas já foi documentada, no entanto não se sabe se isso representa uma invasão verdadeira com colonização e proliferação microbiana no interior do tecido ou apenas o deslocamento das bactérias para os tecidos moles durante os estágios avançados da doença (Listgarten, 1965,). Além disso, os microrganismos produzem uma grande variedade de enzimas solúveis que digerem as proteínas do hospedeiro e outras moléculas produzindo nutrientes para seu crescimento. Eles também liberam muitos produtos metabólicos como amônia, indol, sulfeto de hidrogênio e ácido butírico. Dentre as enzimas liberadas encontram-se as proteases capazes de digerir colágeno, elastina, fibronectina, fibrina e diversas outros componentes da matriz intercelular dos tecidos epitelial e conjuntivo. Uma protease que merece atenção especial é a Arg-1 produzida pelo *P. gingivalis*, que tem grande potencial patogênico e capacidade de induzir uma forte resposta imune humoral (Aduse-Opoku et al., 1995). Apesar da capacidade dos microrganismos em produzir uma multiplicidade de proteases, a principal atividade de protease no sulco gengival é aquela que se origina do hospedeiro. As metaloproteinases da matriz são as principais, são provenientes de células semelhantes aos neutrófilos e fibroblastos e são ativadas no sulco gengival (Sorsa et al., 1990). O efeito de muitos produtos estruturais, enzimáticos e residuais consiste em estimular, de maneira nociva, a produção de citocina celular do hospedeiro. As citocinas assim produzidas são predominantemente pró-inflamatórias e possuem efeitos que intensificam a resposta inflamatória (Sorsa et al., 1990).

Os lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias gram-negativas são capazes de estimular uma resposta inflamatória e uma resposta imune quando interagem com as células do hospedeiro. Esses LPS e as proteínas ou polissacarídeos liberados pelos microrganismos subgengivais ativam os mediadores químicos da inflamação, causando aumento da permeabilidade vascular e estimulando, através de ações quimiotáticas, o deslocamento de células inflamatórias para os tecidos e fazendo com que as células de defesa liberem agentes e citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β . As respostas imunes aos microrganismos serão direcionadas, principalmente, contra as proteínas e polissacarídeos da membrana externa e contra enzimas e toxinas liberadas fora das células. Essas reações imunes provocarão a liberação adicional de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, o que causará aumento da inflamação com maiores danos ao hospedeiro. A *P. gingivalis* possui algumas moléculas capazes de produzir reações imunológicas intensas, chamadas imunodominantes. Essas moléculas imunodominantes incluem a Arg-1, fimbrilina tipo I e II, proteínas de choque térmico e vários outros antígenos de superfície que se acredita serem capazes de produzir uma resposta de anticorpos excessiva no hospedeiro (Lindhe, 1997)

Desta maneira, a patogênese é o modelo pelo qual ocorre a destruição das estruturas de sustentação dental, como resultado da ação ineficaz e frustrada do sistema de defesa do hospedeiro em resposta ao acúmulo do biofilme ou por uma super-resposta do hospedeiro contra os periodontopatógenos. Este processo patogênico apresenta diferenças na extensão e severidade no próprio indivíduo (em diferentes sítios) e entre indivíduos diferentes e as razões para isso são multifatoriais (Page & Kornman, 1997).

Independente da susceptibilidade do indivíduo, o biofilme dental desempenha um papel fundamental no processo patogênico, de modo que o método mais aceito para interromper a destruição periodontal é o emprego de uma estratégia antimicrobiana, na qual a raspagem e alisamento radicular, assim como a manutenção de uma boa higiene oral são geralmente eficazes (Page & Kornman, 1997).

Com os avanços em genômica, epigenética e proteômica houve um aumento do interesse nos fatores biológicos que definem uma complexa rede regulatória que pode resultar em saúde ou doença. Um modelo de patogêneses da periodontite baseado nos sistemas biológicos poderia permitir aos investigadores uma melhor comunicação e inter-relação dos diversos fatores relacionados com a iniciação e resolução da doença (Hood et al., 2004). Kornman (2008) mostrou que muitos fatores considerados importantes para a patogênese da periodontite em 1997 continuam relevantes atualmente, entretanto a estrutura agora é baseada na organização hierárquica e as interações são refletidas nos genes, proteínas e padrão de expressão de metabólitos. Nesse modelo estão incluídas não somente observação dos parâmetros clínicos, como o fumo, mas também a observação dos tecidos e células do hospedeiro. Portanto, a expressão biológica de uma rede imunoinflamatória, que pode levar a destruição dos tecidos periodontais de suporte e do osso alveolar, é determinada pelos fatores microbianos e uma combinação específica dos fatores ambientais e variações genéticas de cada indivíduo.

2.1.2 O Papel das Bactérias na Patogênese da DP.

A destruição periodontal pode ser causada por diversos patógenos que podem atingir a cavidade oral de uma maneira geral nas DP generalizadas ou ser sítio-específica nas DP localizadas (Haffajee & Socransky, 1994). No entanto, essa infecção possui algumas características que dificultam seu estudo, como mostrado na literatura (Socransky et al., 1987 e Socransky & Haffajee, 1990).

1. Mais de 400 espécies bacterianas podem ser cultivadas de bolsas periodontais de diversos indivíduos (Socransky et al., 1987 e Socransky & Haffajee, 1990);

2. Muitas espécies no interior das bolsas são difíceis de cultivar e muito difíceis de identificar (Socransky et al., 1987 e Socransky & Haffajee, 1990);

3. As delimitações físicas da bolsa periodontal dificultam a obtenção de uma amostra significativa desses microrganismos, ou seja, uma amostra que contenha

o patógeno e baixo número de espécies contaminantes (Socransky et al., 1987 e Socransky & Haffajee, 1990);

4. Os sítios nos indivíduos não parecem estar progredindo ativamente todo o tempo, de modo que o período de amostragem pode ter papel importante, bem como o sítio da amostragem para a compreensão da patogênese da DP (Socransky et al., 1987 e Socransky & Haffajee, 1990);

5. Existem diferentes tipos de DP destrutivas (agressiva, crônica, localizada, generalizada) que, na maior parte, não podem ser diferenciadas em bases clínicas, dificultando assim a classificação dessas doenças (Socransky et al., 1987 e Socransky & Haffajee, 1990);

6. Diferentes sítios podem sofrer destruição periodontal como resultado da ação de diferentes patógenos ou podem apresentar atividade de doença por ação de um único patógeno em um momento e por ação de um segundo patógeno mais tarde (Socransky et al., 1987 e Socransky & Haffajee, 1990);

7. Bactérias oportunistas podem crescer como resultado da DP, como essas infecções são mistas é difícil determinar o papel de cada espécie na etiologia da DP (Socransky et al., 1987 e Socransky & Haffajee, 1990);

8. As infecções podem ser mistas, o que torna difícil avaliar todas as possíveis associações entre os patógenos (Socransky et al., 1987 e Socransky & Haffajee, 1990);

9. Os patógenos são frequentemente transportados em baixos números na cavidade oral de indivíduos livres de DP destrutiva, denominado “estado de portador”, tornando seu papel na doença mais difícil de ser avaliado (Socransky et al., 1987 e Socransky & Haffajee, 1990);

10. As linhagens de patógenos colonizantes podem diferenciar em virulência. Tipos clonais não virulentos podem ser identificados em indivíduos periodontalmente saudáveis, enquanto tipos clonais virulentos podem ser observados em indivíduos com DP (DiRienzo & Slots, 1990).

Depois disso foram realizadas análises de amostras de biofilme que sugeriram que há uma ordem na microbiota que coloniza o sulco gengival ou bolsa periodontal. O biofilme subgengival é frequentemente caracterizado por

microrganismos gram-negativos móveis localizados adjacentes ao epitélio da bolsa periodontal, enquanto bastonetes e cocos formam uma estreita camada de bactérias no esmalte ou superfície radicular (Listgarten, 1976). Algumas das espécies que colonizam a bolsa periodontal aparecem associadas no biofilme subgengival, por exemplo, a *P. gingivalis* é quase sempre encontrada em amostras de *Tannerella forsythia*, podendo sugerir que *T. forsythia* antecede de alguma maneira a colonização da *P. gingivalis* (Gmur et al., 1989). Outra associação encontrada foi entre a *P. gingivalis* e *T. denticola* (Simonson et al., 1992b) e *F. nucleatum* e *P. intermédia* (Ali et al., 1994).

Socransky e colaboradores (1998) realizaram um estudo com objetivo de determinar como os periodontopatógenos conhecidos se organizavam em comunidades para sobreviver no biofilme subgengival. A partir desse estudo ele identificou alguns patógenos e criou os complexos bacterianos divididos em cores diferentes de acordo com a relação dos microrganismos dentro do biofilme, sendo o grupo vermelho aquele que apresenta as bactérias com maior potencial patogênico (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*).

Em relação aos patógenos periodontais, estudos em animais têm valor limitado em determinar a patogenicidade de isolados humanos, isso ocorre porque os microrganismos implantados no tecido gengival ou na bolsa periodontal dificilmente conseguem se estabelecer. A principal causa dessa falha é a competição da microbiota residente do animal com o microrganismo que foi inoculado, por isso animais “germ-free” são muito utilizados. Entretanto, há dificuldade em analisar os resultados pela ausência de uma competição entre a microbiota. Devido a esses problemas alguns outros critérios têm sido incluídos para determinar uma bactéria como patógeno periodontal. Esses critérios incluem associação, eliminação, resposta do hospedeiro, fatores de virulência, estudos em animais e avaliação de risco. A decisão não é baseada em apenas um critério, mas na avaliação de todos eles (Haffajee & Socransky, 1994).

2.1.3 *Porphyromonas gingivalis*

P. gingivalis é comprovadamente um patógeno periodontal do grupo dos *Bacteroides* pigmentados de preto. Essa bactéria é a segunda mais estudada como

provável patógeno periodontal. São bactérias gram-negativas, anaeróbias, imóveis e usualmente exibem morfologia de pequenos bastonetes. Esses microrganismos formam colônias marrons e pretas em placas de Agar sangue, que foram inicialmente agrupados como espécies únicas *Bacteriodes melaninogenicus* (Burdon, 1928). Os *Bacteróides* pigmentados de preto têm uma longa história com a DP desde os primeiros estudos de Burdon e dos estudos de infecção mista de Macdonald e colaboradores (1956) e tem despertado muito interesse em estudos. Na década de 70 era aceito que os *Bacteróides* pigmentados de preto que eram assacarolíticas, incluíam o *P. gingivalis* e com nível intermediário de fermentação de carboidrato, permitia incluir no grupo a *Prevotella intermedia* ou que eram sacarolíticas o que permitia a inclusão da *Prevotella melaninogenica* (Haffajee & Socransky, 1994).

O interesse na *P. gingivalis* e outras bactérias do grupo pigmentado de preto surgiu pelo seu papel essencial em infecções experimentais mistas (Macdonald et al., 1956; Macdonald et al., 1963; Socransky & Gibbons, 1965) e pela produção de uma grande quantidade de fatores de virulência como a enzimas bacterianas, incluindo aquelas que destroem imunoglobulinas, endotoxinas, ácidos graxos, H₂S, NH₃, indol, fator inibidor de fibroblasto, indução de fatores que levam a reabsorção óssea, indução de citocinas produzidas por diversas células do hospedeiro e por invadir células epiteliais *in vitro* (Haffajee & Socransky, 1994). Como parte dos fatores de virulência da *P. gingivalis* tem sido demonstrado que ela possui moléculas/estruturas essenciais para interações com o hospedeiro. Especificamente essa espécie é caracterizada por destruir uma variedade de tecidos e células, de invadi-las e nelas se multiplicar (Holt et al, 1999). O evento inicial da patogenicidade da *P. gingivalis* é a interação (aderência) na cavidade oral (Darveau et al., 1997). Para realizá-la a *P. gingivalis* emprega vários componentes bacterianos como fímbrias, proteases, hemaglutininas e lipolissacarídeos (Holt et al., 1999). As fímbrias da *P. gingivalis* participam de quase todas as interações bactéria/bactéria e bactéria/hospedeiro. A aderência bacteriana à mucosa e às superfícies dentais, bem como a coagregação bacteriana são etapas essenciais para a colonização de várias espécies

bacterianas. As fímbrias da *P. gingivalis* são determinantes críticos para cada um desses processos (Hamada et al., 1994). Elas são os principais determinantes de adesividade na superfície da célula desses patógenos e são críticas para uma colonização bem sucedida e para o processo de doença em sistemas experimentais (Amano et al., 1997). Essas fímbrias também podem se ligar especificamente a um domínio de certas proteínas ricas em prolina na saliva humana. Evidência recente indica que esse domínio aparece conservado em vários estreptococos orais, sugerindo a resposta adaptativa evolucionária da *P. gingivalis* para aprimorar o seu potencial de colonização do hospedeiro (Kataoka et al., 1997).

A *P. gingivalis* tem a capacidade de se coagregar com outras bactérias e essa interação com outros membros da cavidade oral resulta em coagregações específicas, que contribuem para a habilidade dos microrganismos em colonizar efetivamente o sulco gengival (Holt et al., 1999). Por exemplo, o *Actinomyces naeslundii* (*A. naeslundii*) é colonizador inicial dos biofilmes orais e parece favorecer a colonização da *P. gingivalis* por meio das habilidades de coagregação. A especificidade para essa interação tem sido identificada como uma glicoproteína de grande tamanho molecular na superfície do *A. naeslundii*, o que também parece capacitar essa espécie para interagir com outros microrganismos no biofilme oral (Yamaguchi et al., 1998). De forma similar, a ligação entre essas duas bactérias parece estar relacionada às proteases cisteínicas, como as gingipaínas, dessas espécies (Budu et al., 2003).

A maioria dos estudos sobre coagregação bacteriana nos biofilmes orais enfoca as habilidades das espécies patogênicas “clímax”, tais como *P. gingivalis*, de ligar-se aos colonizadores iniciais ou intermediários dessa complexa ecologia microbiana. Enquanto se dá importância a forte coagregação entre a *P. gingivalis* e *F. nucleatum* como um importante microrganismo de ligação na microbiota subgengival, nem todos os isolados dessas espécies são capazes de realizar essa ligação. Com pares selecionados parece que a galactose pode inibir especificamente esse processo de ligação (Metzger et al., 2001). Não apenas essa propriedade de uma espécie relaciona-se com o favorecimento da

colonização via ligação direta, como tem sido obtida evidência sugerindo que o *F. nucleatum* facilita a sobrevivência das bactérias anaeróbicas estritas em ambientes com oxigênio por meio dessas interações inter-bacterianas (Bradshaw et al., 1998). Kamaguchi e colaboradores (2008) identificaram que a *P. gingivalis* pode coagregar-se com a *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) como uma interação potencial no biofilme mais amadurecido da DP. A *P. gingivalis* também pode agregar numerosas bactérias orais por meio de suas vesículas, que tem a capacidade de “ligar” espécies não-agregantes. São essas capacidades de ligação da *P. gingivalis* que podem contribuir para a formação de interações entre múltiplas espécies na cavidade oral. A coagregação, portanto, parece ser uma importante estratégia de colonização dos microrganismos orais, envolvendo numerosos ligantes superficiais e receptores, incluindo as fímbrias da *P. gingivalis* (Kamaguchi et al., 2001).

As bactérias interagem entre si como citado acima, mas também ocorre uma interação entre as bactérias e o hospedeiro, que é muito importante para o desenvolvimento do processo patológico. A interação da *P. gingivalis* e outros membros do complexo vermelho com as células epiteliais no ambiente subgengival fornecem uma excelente estratégia para a destruição dos tecidos do hospedeiro. Anatomicamente, quando uma superfície dental saudável é exposta às bactérias formadoras de biofilme, elas inicialmente se ligam à superfície dental e estendem-se para o sulco gengival. Na base do sulco, o epitélio gengival forma um epitélio juncional delgado, diretamente ligado ao dente. Esse epitélio não possui queratinização, tem diferenciação limitada. O epitélio juncional é, portanto, prontamente susceptível à invasão pela *P. gingivalis* e outros membros desse meio. As células de epitélio juncional estão, portanto, diretamente expostas às bactérias e aos seus produtos (Holt et al., 1999). Enquanto a *P. gingivalis* tem sido relatada nos tecidos gengivais e algumas cepas encontradas dentro das células epiteliais, onde elas provavelmente são capazes de crescer e de se reproduzir, as interações detalhadas *in situ* das células epiteliais e das bactérias invasoras não tem sido claramente definidas (Saiki et al., 2004).

Todavia, a *P. gingivalis* tem desenvolvido uma variedade de moléculas/estruturas que interagem com as macromoléculas do hospedeiro (como as proteínas salivares/glicoproteínas, componentes da matriz extracelular) e células (Andrian et al., 2004). As fímbrias são estruturas protéicas longas e finas que cobrem e estendem-se a partir da parede celular na maioria das cepas desse microrganismo. Esses apêndices finos e capilares são capazes de ligar-se a uma variedade de componentes do hospedeiro, incluindo células epiteliais, fibroblastos, macromoléculas salivares humanas, hemoglobina e matriz extracelular (Márquez-San Miguel et al., 2003; Kontani et al., 1996; Amano et al., 1996; Amano et al., 1995; Amano et al., 1994; Amano et al., 2003). As interações iniciais da *P. gingivalis* com as estruturas do hospedeiro ocorrem na presença de várias proteínas do hospedeiro, incluindo o fibrinogênio e a fibronectina (Nagata et al., 1994; Irakami et al., 1997). Enquanto tem sido sugerido que algumas dessas proteínas inibem as interações da *P.gingivalis*-células do hospedeiro, muitas proteínas, isto é, proteínas ricas em prolina, glicoproteínas salivares e estaterinas podem funcionar como receptores específicos, favorecendo essa interação inicial (Amano et al., 1994 Gibbons & Hay, 1988).

Embora a função primária das fímbrias seja a ligação inicial às superfícies do hospedeiro, outra função tem sido reconhecida, suportando a idéia de que essas estruturas da superfície bacteriana disparam sinais intracelulares entre a bactéria e as células do hospedeiro durante a invasão (Holt & Ebersole, 2007).

Além das propriedades de adesão e coagregação, a *P. gingivalis* tem um conjunto de mecanismos para interagir e colonizar cronicamente os tecidos do hospedeiro. Entretanto, a expansão bem sucedida da população requer replicação e competição por nutrientes no ambiente do hospedeiro. Assim, o sustento das espécies é crucial para sua sobrevivência continuada. Além disso, é necessário que surjam patógenos oportunistas comensais em um ambiente hospedeiro ocupado por espécies bacterianas competidoras, bem como moléculas do hospedeiro designadas para minimizar a disponibilidade de nutrição para as bactérias. Sugere-se que essa estratégia esteja diretamente ligada a biomoléculas relacionadas aos requisitos fisiológicos dessas bactérias que são susteninas, que

podem ser considerados fatores críticos de virulência para a patogenicidade desses microrganismos (Holt & Ebersole, 2007).

Existem as proteinases que fornecem nutrientes para o crescimento bacteriano no ambiente do biofilme. Dentro de um hospedeiro acredita-se que essas macromoléculas funcionem como enzimas degradativas não específicas para uma variedade de proteínas do hospedeiro (Imamura, 2003). Essas enzimas se mostraram capazes de causar ativação e inativação de moléculas bioativas do hospedeiro, sendo, portanto importantes para sobrevivência da bactéria, com danos colaterais ao hospedeiro. Por isso as proteinases da *P. gingivalis* são consideradas importantes fatores de virulência na progressão da DP. Tem sido demonstrado que elas degradam o colágeno dos tipos I e IV, componentes principais do tecido conjuntivo periodontal, e proteínas da matriz extracelular, como fibrinogênio e laminina (Masada et al., 1990; Kadowaki et al., 1994). Uma atividade proteolítica inicial estava ligada a uma proteinase semelhante à tripsina, que tem sido relacionada com a virulência da *P. gingivalis* (Greiner & Mayrand, 1987; Kesavalu et al., 1995; Smalley et al., 1989). A essa família das proteases foi dado o nome de “gingipaínas” (Curtis et al., 1999), tendo sido consideradas como desempenhando um papel crítico na fisiologia normal dessa espécie, bem como contribuindo para infecções mediadas pela *P. gingivalis* e a destruição tecidual vista na progressão da periodontite. As gingipaínas são responsáveis por pelo menos 85% da atividade proteolítica geral apresentada pela *P. gingivalis* e 100% da expressão da atividade semelhante à tripsina (Imamura, 2003). A *P. gingivalis* produz outras enzimas além das gingipaínas que possuem algum papel nos eventos destrutivos do periodonto, como proteases de largo espectro (Bourgeau et al., 1992), uma enzima semelhante à endotelina (Awano et al., 1999) peptidase dipeptidil (Kiyama et al., 1998) e uma protease nomeada periodontaína que degrada proteínas desnaturadas e polipeptídeo (Nelson et al., 1999). Além disso, a *P. gingivalis* produz uma exopeptidase que a torna capaz de processar polipeptídeos em peptídeos menores na superfície celular, cujos produtos são facilmente transferidos através do envelope celular ao interior da célula para uso como fontes de carbono e energia. Ela também é capaz de atuar no

processamento final dos produtos de degradação do colágeno, estando esses compostos derivados do tecido conjuntivo presentes em altas concentrações no tecido gengival doente (Holt & Ebersole, 2007).

Assim parece que a *P. gingivalis* desenvolve várias atividades proteolíticas e enzimáticas que a capacitam para competir efetivamente no ambiente periodontal por substratos para metabolismo, crescimento e replicação. A amplitude dessas atividades sugeriria um papel crítico na virulência tanto da espécie individual como do biofilme complexo em sítios doentes. Com base na ampla especificidade dessas enzimas, os dados disponíveis sugerem que o dano tecidual do hospedeiro é colateral às necessidades fisiológicas da *P. gingivalis*, uma estratégia de virulência comum dos patógenos oportunistas comensais (Holt & Ebersole, 2007).

A *P. gingivalis* também pode interferir com o funcionamento da rede de citocinas necessárias para manter a saúde periodontal. O organismo é capaz de alterar a secreção e o acúmulo de quimiocinas selecionadas, interferindo com a secreção da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e interleucina-8 (IL-8) pelas células mononucleares da circulação periférica. Quando os níveis de IL-8 e MCP-1 bem como a produção de quimiocinas nas células endoteliais desafiadas pela *P. gingivalis* foram acessadas observou-se que essa bactéria degrada a IL-8 e MCP-1 secretada pelas células endoteliais (Kobayashi-Sakamoto et al., 2003). Funcionalmente, as proteases da *P. gingivalis* devem agir *in vivo* para degradar as quimiocinas secretadas pelas células endoteliais e com isso reduzir o recrutamento dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) em sítios infectados. Essa interferência no recrutamento e a migração dos PMN por meio do endotélio deve contribuir para o retardamento da resposta imune do hospedeiro, o que resulta em periodontite ativa. Também é possível que a degradação das quimiocinas do hospedeiro no tecido gengival infectado pode afetar os mecanismos inatos de defesa no periodonto infectado, o qual é ocupado por numerosas espécies bacterianas. Os baixos níveis de quimiocinas devem interferir na habilidade do hospedeiro em reconhecer essas espécies bacterianas invasoras e direcionar os PMN para removê-las. Essa interferência com o sistema de reconhecimento

bacteriano do hospedeiro deve resultar no crescimento da microbiota residente. As gingipaínas da *P. gingivalis* também são capazes barrar a IL-8, um importante quimioatrativo de PMN. As vesículas da parede celular, lançadas no ambiente do hospedeiro, também são capazes de degradar a IL-8, fornecendo proteção significativa frente às defesas do hospedeiro. Assim as gingipaínas da *P. gingivalis* conferem um importante mecanismo quimiotático para a atividade neutrofílica. Essas enzimas são capazes de induzir eventos fagocíticos, enquanto controlam esses eventos de modo que a fagocitose não ocorra. A destruição dos neutrófilos antes de agirem confere à bactéria invasora nutrientes proteolíticos importantes para o metabolismo e crescimento. Portanto as proteinases de *P. gingivalis* são consideradas fatores importantes de virulência na progressão da DP (Holt & Ebersole, 2007). Além disso, elas podem romper os mecanismos de defesa do hospedeiro incluindo imunoglobulinas e componentes do sistema complemento (IgG, IgA, C3), muitas citocinas do hospedeiro (TNF- α , IL-6) e inibir a geração de radicais de oxigênio nos leucócitos ativados (kadowaki et al, 1994).

Essa ativação do sistema complemento na resposta à infecção ou invasão iminente por um corpo estranho (LPS e proteases da bactéria) é provavelmente a primeira linha mais efetiva de defesa ativada pelo hospedeiro e a *P. gingivalis* tem mecanismos desenvolvidos para desviar ou escapar do ataque do complemento. Elas conseguem isso por meio do uso de suas proteases específicas altamente concentradas (Holt & Ebersole, 2007). As gingipaínas desenvolveram mecanismos para uso do sistema complemento em seu próprio benefício. Inicialmente elas são capazes de degradar o C3, cuja ativação normal resulta na formação de C3a e C3b (Wingrove et al., 1992). Ambas as moléculas agem no início da eliminação de uma espécie bacteriana invasora. O C3b é necessário inicialmente para a opsonização da partícula, bem como para formar o complexo C5 convertase, essencial para a síntese de C5a, um potente fator quimiotático. A degradação de C3a e C3b confere à bactéria uma vantagem distinta de sobrevivência, entretanto é interessante o fato das gingipaínas negligenciarem quase totalmente a segunda função do C3b e ativar diretamente o C5 e C5a em uma taxa significativamente mais rápida do que o complexo C5 convertase do hospedeiro. Enquanto esse

segundo efeito poderia ser a proposta para colocar a bactéria invasora em certa desvantagem, a *P. gingivalis* desenvolveu um mecanismo para interferir com essa função protetora do hospedeiro. Ela forma diversas vesículas da parede celular em sua superfície que são liberadas para o ambiente circundante durante o crescimento. Essas vesículas contêm grandes quantidades de protease bacteriana, sendo a maioria capaz de degradar os receptores C5a do hospedeiro na superfície dos neutrófilos de ataque. (Jagels et al, 1996a; Jagels et al., 1996b). A destruição dessa importante proteína quimiotática para neutrófilos resulta na perda da função fagocítica. Isso, por sua vez, leva à destruição dos PMN e à resultante degranulação e liberação de grandes quantidades de enzimas hidrolíticas associadas aos PMN que poderiam afetar posteriormente outras células do hospedeiro e causar destruição tecidual (Holt e Ebersole, 2007)

Em relação aos achados relacionados à DP, alguns estudos (Bragd et al., 1987; Haffajee et al., 1988; van Winkelhoff et al., 1988) indicam uma forte associação da *P. gingivalis* com DP e demonstraram que essa espécie é incomum ou está em baixo número em casos da saúde periodontal ou gengivite, entretanto é freqüentemente encontrada nas formas destrutivas da doença. Além disso, após tratamento periodontal bem sucedido ocorre uma redução no número dessa espécie, mas é comum também encontra-las em sítios com recorrência da doença.

Tem sido demonstrado também que a *P. gingivalis* induz uma elevada resposta imune local e sistêmica no hospedeiro em várias formas de periodontite (Mahanonda et al., 1991). Com isso as pesquisas foram direcionadas no sentido de comparar os níveis da resposta de anticorpos no hospedeiro com e sem a DP, examinando a relativa eficiência desses anticorpos e suas subclasses (Lopatin et al., 1991, 1992; Mooney et al., 1987; Whitney et al., 1992), o efeito do tratamento (Chen et al., 1991; Johnson et al., 1993) e a natureza dos antígenos que levam a elevada resposta imune (Laosrisin et al., 1990; Curtis et al., 1991; Duncan et al., 1993). Ogawa e colaboradores (1989) mostraram uma média de 5% de plasmócitos nas lesões de periodontite avançada formando anticorpos às fimbrias da *P. gingivalis*. Entretanto, o consenso que existe em estudos sobre a ação dos

anticorpos em respostas aos periodontopatógenos é que muitos, mas não todos, hospedeiros com experiência de perda de inserção por periodontite apresentam elevados níveis de anticorpos para os antígenos da *P. gingivalis*, sugerindo que essa espécie ganha acesso aos tecidos subjacentes e pode iniciar ou contribuir para a patologia da DP (Haffajee & Socransky, 1994).

Essa forte associação da *P. gingivalis* com a DP foi demonstrada não somente na doença que ocorre naturalmente em humanos, mas também na doença induzida por ligaduras em cachorros, ovelhas e macacos (Haffajee & Socransky, 1994). Essa espécie fica elevada em sítios com lesão comparados a sítios saudáveis em casos de DP que ocorre naturalmente, quando a DP é induzida pela colocação de ligaduras em cachorros ou macacos há um aumento no número da espécie concomitante com o início da DP (Haffajee & Socransky, 1994).

Holt e colaboradores (1988) apresentaram achados interessantes. Foi demonstrado que a supressão da microbiota pela administração sistêmica de Rifampin (Rifampicina) e sem a presença de *P. gingivalis*, não foi capaz de induzir a DP pela colocação de ligaduras, mas a reintrodução da *P. gingivalis* resultou em início e progressão das lesões. Assim como o *Aa*, a *P. gingivalis* tem a capacidade de invadir as células epiteliais do tecido gengival e têm sido freqüentemente encontrada em grande número nas células epiteliais que recobrem as bolsas periodontais associadas com a presença de biofilme (Dzink et al., 1989).

Estudo em macacos e ratos tem indicado que a imunização com os microrganismos completos ou com seus antígenos específicos afeta a progressão das lesões periodontais, sendo que na maioria deles ocorre uma diminuição da progressão da DP (Evans et al., 1992). Entretanto, Ebersole e colaboradores (1991) observaram aumento da severidade de DP após a imunização. Essas diferenças podem ocorrer por diversos motivos: pelas diferentes espécies de animais utilizadas nos trabalhos, pelo protocolo de indução da DP, pela preparação do antígeno ou método de imunização. Haffajee & Socransky (1994) fizeram uma revisão de literatura e concluíram que ocorre uma alteração no equilíbrio da resposta imune do hospedeiro pelos altos níveis de anticorpos para

os antígenos da *P. gingivalis*, afetando a progressão da DP. Os dados apresentados acima reforçam a importância dessa bactéria na DP em humanos e em modelos animais.

2.2 Doença periodontal experimental em animais

Os modelos animais têm sido utilizados com frequência para estudos experimentais de indução de DP, devido a dificuldade de estudar a patogênese dessa doença em humanos. Dentre os animais mais utilizados para indução de doenças experimentais estão os ratos por apresentarem algumas vantagens como serem de fácil manuseio, podem ser colocados em condições “germ-free” com facilidade, bem como podem ser usadas linhagens procriadas em condições de imunodeficiência e a destruição periodontal tem progressão rápida (Klausen, 1991). Além disso, a DP induzida em ratos tem se mostrado histologicamente comparável à doença em humanos (Gupta & Shaw, 1956). Como modelo experimental os ratos podem ser utilizados para estudos de patogenicidade, estudos imunológicos e de imunização, e apresentam estruturas periodontais que incluem epitélio oral, epitélio sulcular, epitélio juncional, fibras colágenas periodontais cemento celular e acelular e osso alveolar muito semelhantes aos humanos (Page & Schroeder, 1982). A principal diferença é que o epitélio sulcular é queratinizado, podendo alterar a interação entre os metabólitos do biofilme aderido à superfície dental e o tecido gengival. Entretanto, estudos têm demonstrado que esses metabólitos penetram no tecido conjuntivo via epitélio juncional, o que descarta a influência da queratinização do epitélio sulcular (Fisher & Klinge, 1994).

Quanto à sua dentição, os ratos possuem um dente incisivo e três molares por hemiarcada. Como os incisivos possuem crescimento contínuo, os molares são selecionados para indução de DP experimental. Os ratos apresentam também erupção passiva dos dentes para compensar a atrição de superfícies oclusais que ocorre com o aumento da idade dos animais, além de haver uma migração distal desses dentes isso faz com que ocorra uma contínua remodelação alveolar. No entanto, a distância entre a junção cemento-esmalte e a crista alveolar permanece

a mesma em ratos livres de DP, não interferindo, portanto na indução de DP experimental nesses animais (Klausen, 1991).

Bactérias comprovadamente patogênicas em humanos como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *P. gingivalis*, *Capnocytophaga sputigena*, *Eikenella corrodens* e *Fusobacterium nucleatum* podem exercer patogenicidade em experimentos animais. Outros microrganismos também apresentam potencial periodontopatogênico como *Streptococcus sobrinus* e *Actinomyces viscosus* (Irving et al., 1974, 1975)

Os achados clínicos e histológicos da evolução da DP em humanos são semelhantes em ratos. O tecido conjuntivo apresenta um infiltrado inflamatório contendo linfócito T e B, macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares, que migram através do epitélio para a bolsa periodontal (Irving et al., 1974). Ocorre também o deslocamento da margem gengival, aumento e proliferação do epitélio oral para o tecido conjuntivo subjacente, infiltrado inflamatório celular, migração apical do epitélio juncional e reabsorção da crista óssea alveolar e na região interradicular, com reabsorção de cemento (Klausen, 1991).

Um modelo de indução largamente utilizado em animais consiste na colocação de ligaduras de fio de algodão ao redor dos dentes, no nível do sulco gengival, permitindo acúmulo do biofilme bacteriano e provocando inflamação gengival (Johnson, 1975; Sallay et al., 1982). Além da colocação de ligaduras a DP pode ser induzida por 2 outros meios: inoculação de periodontopatógenos, com a características de uma monoinfecção diferente do que ocorre em humanos; administração de uma dieta macia para acúmulo de biofilme na região supra-gengival. Entretanto, o meio mais utilizado para indução de DP é a colocação de ligaduras (Galvão et al., 2003). Em relação à inoculação de microrganismos para indução de DP experimental em ratos a *P. gingivalis* é muito utilizada (Baker et al., 1994; 1999; 2000; 2002). Uma cepa utilizada com frequência e comprovadamente patogênica em modelo animal é a W83 (Nelson, 2003).

Existem estudos avaliando o tempo de indução da DP, mas com variações entre eles. Johnson (1975) observou reabsorção da crista óssea alveolar, por meio de análise radiográfica 17 dias após a colocação de ligaduras nos primeiros

molares inferiores. Sallay e colaboradores (1982) observaram que com 9 dias se observava inflamação aguda, seqüestro ósseo e destruição da crista óssea. Bezerra e colaboradores (2000) observaram que a perda óssea alveolar em modelos de periodontite experimental em ratos pode ser vista em 4 dias de indução da DP, alcançando um pico máximo aos 7 dias, persistindo inalterado até os 11 dias.

Com isso pode-se dizer que os modelos animais vem contribuindo muito para o estudo em várias áreas da periodontia como regeneração periodontal, e estudos de patogenicidade, imunológicos e de imunização (Page & Schroeder, 1982; Klausen, 1991).

2.3 Biofilme dental em ratos

A etiologia da DP é multifatorial e os depósitos bacterianos no biofilme dental possuem papel essencial na sua patogênese (Page & Kornman, 1997). Alguns estudos sugerem que o processo inflamatório induzido pelas ligaduras é causado por uma infecção bacteriana. Rovin e colaboradores (1966) observaram que o uso de ligaduras em ratos “germ-free” não foi capaz de desenvolver a DP. Sallay e colaboradores (1982) não observaram destruição periodontal quando a indução de doença com ligadura foi associada com o uso de antibióticos. A partir desses estudos é possível confirmar a importância das bactérias do biofilme dental no desenvolvimento da DP.

Entretanto, já foi demonstrado que a microbiota residente no periodonto de ratos é diferente daquela presente em humanos (Macdonalds et al., 1959). Desde que se mostrou que a microbiota gengival da DP em humanos é capaz de produzir uma infecção anaeróbica é possível determinar se essas bactérias no rato podem produzir uma infecção similar e permitindo assim a comparação da progressão da DP em humanos com os modelos animais (Macdonalds et al., 1959).

O biofilme dental em ratos consiste a princípio de *Streptococcus sp.* e na medida em que se torna mais espesso, com 30 dias aproximadamente, os microrganismos anaeróbios podem constituir até 25% da microbiota oral. Após seis meses, surgem espiroquetas, que proliferam de forma considerável (Isogai et

al., 1985). Socransky e colaboradores (1960) observaram que a DP em ratos não é acompanhada de uma total proliferação da microbiota. Há um aumento na contagem total de microrganismos atribuída a componentes específicos dessa microbiota, os enterococcus e possivelmente os actinobacilos com aumento proporcional em todas as espécies. Isso não pode ser observado na DP em humanos, em que toda a microbiota é proliferada (Hemmens and Harrison, 1942; Rosebury et al., 1950). A DP pode se desenvolver na presença de microrganismos gram-positivos ou gram-negativos. Irving e colaboradores (1974, 1975) testaram os gram-positivos *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus* ou *Streptococcus mutans* e os gram-negativos anaeróbios do grupo dos *Bacteróides*, isolados de bolsas periodontais. Todos os microrganismos causaram perda óssea alveolar após 84 dias, mas com diferenças patológicas observadas histologicamente. Os gram-positivos causaram perda óssea, mas sem a presença óbvia de osteoclastos. Entretanto, os gram-negativos causaram DP com evidência de migração apical do epitélio, destruição da mucosa e perda óssea associada a grande número de osteoclastos. Listgarten e colaboradores (1977) relataram que uma monoinfecção com *Eikenella corrodens* (gram-negativo) apresentou mudanças patológicas semelhantes às aquelas causadas pelos microrganismos do grupo dos *Bacteroides*. Irving e colaboradores (1977) realizaram um estudo com o intuito de comprovar que a perda óssea com presença de grande número de osteoclastos é predominante na presença de microrganismos gram-negativos. Como resultados eles observaram que as alterações histopatológicas do periodonto induzidas por diferentes bactérias gram-negativas são muito similares, diferente do que foi encontrado por Socransky e colaboradores (1998) que dividiu as bactérias em diferentes complexos de acordo com alguns fatores entre eles a patogenicidade e determinaram as bactérias do grupo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*) como as mais patogênicas. Em geral, há pequena formação de biofilme, ausência de cáries radiculares e severa destruição óssea acompanhada por um número grande de osteoclastos. Essas características estão em contraste com as que acontecem no caso de DP induzida por gram-positivos.

Nesse caso há grande formação de biofilme, presença de cáries radiculares e quantidade bem menor de osteoclastos.

Com esses estudos podemos observar que a DP que ocorre nos ratos tem características semelhantes àquela que ocorre nos humanos, tornando esse modelo de experimental válido para o estudo da progressão da DP.

2.4 Reabsorção Óssea na DP

A perda de osso alveolar é uma característica fundamental na DP destrutiva. É mais provável que a reabsorção óssea ocorra basicamente em consequência ao aumento da atividade osteoclástica, embora possa resultar também da atividade osteogênica reduzida ou prejudicada (Ramfjord & Ash, 1991).

Hausmann (1974) identificou alguns possíveis mecanismos pelos quais os produtos bacterianos do biofilme poderiam causar reabsorção óssea na DP. Dentre eles estaria a ação direta destes produtos sobre células progenitoras, induzindo sua diferenciação em osteoclastos; a ação indireta, via inflamação gengival e liberação de mediadores, que por sua vez irão induzir esta mesma diferenciação celular e ainda a ação química direta de agentes inflamatórios sobre o osso, sem envolver atividade osteoclástica.

A função dos osteoclastos pode ser modulada por diversos fatores derivados da microbiota presente no biofilme dental, liberados por células inflamatórias ou nativos dos tecidos (Ramfjord & Ash, 1991).

Uma das substâncias mais importantes na regulação da função dos osteoclastos são as prostaglandinas (PGE-1 e PGE-2). Estas substâncias são capazes de mediar a resposta inflamatória aguda, modular a resposta imunológica, suprimir a atividade mitótica, alterar a capacidade de síntese de diversas células, suprimir a síntese e renovação do colágeno e induzir a reabsorção óssea (Offenbacher et al., 1993)

A IL-1 e a IL-6 são exemplos de citocinas produzidas e liberadas localmente na DP, em concentrações suficientes, também podem mediar a inflamação tecidual e causar reabsorção óssea, seja inibindo a ação da PGE-2 ou agindo como um potente indutor da perda de cálcio (Masada et al., 1990).

Foram identificados alguns tipos de substâncias capazes de induzir reabsorção óssea, encontradas em material microbiano do biofilme dental, provenientes da gengiva e fatores gerados pela ativação do sistema imunológico. Estas substâncias incluem as PGs e seus precursores e fatores ativadores de osteoclastos, todos estes presentes na gengiva inflamada, além de endotoxinas bacterianas presentes no biofilme dental (Goldhaber et al., 1982).

Fatores locais e sistêmicos regulam o equilíbrio fisiológico do tecido ósseo e quando há uma tendência generalizada para a reabsorção, uma perda óssea iniciada por inflamação local pode ser exacerbada. Esta influência sistêmica na resposta do osso alveolar foi denominada fator ósseo na DP (Glickman, 1951). Em condições fisiológicas o osso é periodicamente reabsorvido pelos osteoclastos, enquanto o novo osso é formado pelos osteoblastos. Os osteoblastos regulam a reabsorção óssea pelos osteoclastos, envolvendo o recrutamento de novos osteoclastos e ativação dos maduros (Suda et al., 1999). Existem algumas moléculas-chaves para regulação do sistema de remodelação óssea como o receptor ativador do ligante do fator κ B nuclear (RANKL), seu receptor celular RANK e o receptor “isca” a osteoprotegerina (OPG). RANKL é o principal estimulador da diferenciação e ativação dos osteoclastos e seus efeitos são neutralizados pela OPG, que inibe a reabsorção óssea impedindo a ligação de RANKL-RANK (Katagiri & Takahashi, 2002). O descobrimento do RANKL e seu receptor OPG confirmou a idéia de que a diferenciação e função dos osteoclastos é controlada pelos osteoblastos, ou seja, o recrutamento de novos osteoclastos é dependente do balanço entre RANKL e OPG nos osteoblastos (Suda et al., 1999).

Na reabsorção óssea inflamatória uma ativação dos linfócitos T pode desencadear reabsorção óssea pela excessiva produção de RANKL e levar a menor expressão da OPG, portanto a expressão de RANKL e OPG também é importante para a patogênese da DP. Sítios com altos níveis de expressão de RANKL apresentam bolsas periodontais mais profundas comparados a sítios negativos para RANKL (Nagasawa et al., 2002). Além disso, Liu e colaboradores (Liu et al., 2003) observaram que os níveis de RANKL eram maiores em casos de periodontite avançada quando comparados a casos de periodontite moderada e

saúde periodontal. Esses autores também demonstraram é expresso em altos níveis em células inflamatórias como linfócitos e macrófagos. Crotti e colaboradores (2003) compararam a expressão de RANKL e OPG em tecidos de granulação adjacentes à áreas de perda óssea alveolar causada por DP com tecidos saudáveis por meio de imunohistoquímica. Níveis significativamente maiores de RANKL foram encontrados nos tecidos com DP, enquanto baixos níveis de OPG foram encontrados nesses mesmos tecidos. RANKL estava relacionada com linfócitos e macrófagos e OPG com as células endoteliais. Mogi e colaboradores (Mogi et al., 2004) analisaram a concentração de RANKL e OPG no fluido gengival de pacientes com DP e saudáveis. Mais uma vez aumento na concentração de RANKL e diminuição da concentração de OPG foram encontrados nos pacientes com DP quando comparados com os pacientes saudáveis e a relação entre RANKL/OPG foi significativamente maior nos pacientes com DP. Esses resultados sugerem que o aumento na produção de RANKL e diminuição de OPG podem estar associados com a perda óssea alveolar que ocorre na DP.

2.5 Sistema Imunológico e Doença Periodontal

O biofilme dental é essencial para o processo patológico. A resposta do hospedeiro a esta agressão sofre grandes variações. A resposta imunológica é portanto a fonte mais provável de variação do hospedeiro, constituindo um fator importante na etiopatogênese da DP (Kinane, 1999).

A periodontite resulta de uma infecção que ocorre pela presença de biofilme bacteriano na região subgengival. Bactérias como *P. gingivalis*, *Aa* e *Tanerella forsythia* são uns dos principais responsáveis pelo início e progressão da DP, sendo que a *P. gingivalis* é encontrada em sítios profundos e com atividade de doença (AAP, 1996; Kojima et al., 1993). A progressão da DP é controlada ou lenta e ocorre melhora nas condições clínicas pela eliminação ou diminuição do número dessas bactérias (Renvert et al., 1996).

A resposta do hospedeiro tem um papel muito importante na patogênese da DP, por contribuir para o processo de doença ou modular os efeitos produzidos

pelas bactérias (Genco, 1992). A resposta imune pode ser tanto protetora quanto destrutiva. Vários componentes do sistema imunológico são ativados na DP. Os neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos variam em número dependendo da condição de saúde ou doença dos tecidos. Os anticorpos locais, sistêmicos e o sistema complemento também participam na patogênese da DP. Estas variáveis do hospedeiro podem influenciar a colonização e invasão bacteriana, destruição tecidual, cicatrização e fibrose (Newman et al., 1992).

Desde 1997 as pesquisas proporcionaram um avanço no conhecimento da infecção oral como um fator que pode potencializar e multiplicar suas influências na ocorrência e severidade das condições sistêmicas e doenças, criando uma íntima relação entre as áreas médica e odontológica (Stamm, 1998). Os antígenos e os fatores de virulência das bactérias desencadeiam uma resposta inflamatória e imune imediata do hospedeiro. A reação do hospedeiro ocorre por meio da produção de citocinas entre outros mediadores inflamatórios que participam da destruição do ligamento periodontal e do osso alveolar (Ishikawa, 2007).

Essa resposta inflamatória também pode ser regulada por modificadores genéticos e ambientais. Page e colaboradores (1997) relataram que as bactérias são essenciais, mas não suficientes para causar a DP. Fatores do hospedeiro e fatores ambientais como o fumo, idade, estresse, doenças sistêmicas são importantes determinantes da ocorrência e severidade da periodontite. As bactérias causam destruição tecidual na DP indiretamente pela ativação de diversos componentes do sistema de defesa do hospedeiro. Quando ativado, esse sistema tem o objetivo de proteger o hospedeiro, mas com o alto custo da destruição dos tecidos de suporte, sendo considerado uma via de mão dupla.

Para ser possível estudar a patogênese da DP, é essencial entender como o sistema imune reage frente ao desafio bacteriano. As células T desempenham importante papel imunoregulatório na patogênese da DP. Gemmel e colaboradores (2006) sugeriram que as células T possuem papel homeostático e que a autoimunidade é um importante componente da inflamação crônica periodontal. A DP é caracterizada pela destruição do ligamento periodontal e osso. Em relação ao osso alveolar, a reabsorção ocorre como resultado do desequilíbrio

entre os processos de reabsorção e formação óssea provocado pela resposta inflamatória do hospedeiro. As citocinas, quimiocinas e PG têm sido identificadas como reguladoras desse processo imune-inflamatório na periodontite. Ocorre a ativação de linfócitos, macrófagos e neutrófilos, que se infiltram no tecido gengival inflamado e secretam mediadores inflamatórios, incluindo a IL-1 e PGE₂. Além disso, as células T-helper tipo 1 e 2 que estão presentes na lesão periodontal levam a hiperregulação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e fator de necrose tumoral α (TNF- α). Essas citocinas podem induzir a reabsorção óssea indiretamente por promover a diferenciação de precursores de osteoclastos e pela ativação dos osteoclastos (Ishikawa, 2007). O recrutamento de osteoclastos depende do balanço entre RANKL e seu receptor isca, OPG, nos osteoblastos. RANKL é o maior mediador da reabsorção óssea na periodontite.

PGE₂ é um importante mediador da destruição dos tecidos na DP. Esse mediador estimula a resposta pró-inflamatória incluindo a osteoclastogênese, pelo aumento na expressão de RANKL. Entretanto a PGE₂ possui papel antiinflamatório, incluindo a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α (Ishikawa, 2007). Noguchi & Ishikawa (2006) mostraram que a PGE₂ tem habilidade de diminuir a hiper-inflamação que ocorre nas lesões periodontais e estimula a cicatrização da ferida.

Similar aos fatores ambientais, os fatores do hospedeiro, como hereditariedade, idade, doenças sistêmicas são importantes determinantes da ocorrência e severidade das doenças infecciosas. Com os recentes avanços da ciência, genes responsáveis por várias doenças têm sido identificados. Características genéticas podem estar associadas com alto risco para DP, incluindo função fagocítica anormal, reduzida capacidade de produzir imunoglobulina G2 (IgG2), polimorfismos no TNF- α , IL-1 α , entre outras. (Page et al., 1997).

Mais uma consequência do desafio bacteriano do biofilme é o estresse oxidativo causado pela presença das bactérias, o qual pode favorecer a periodontite, obesidade, diabetes tipo II, eventos vasculares e partos prematuros. As bactérias reativas ao oxigênio têm sido aplicadas na patogênese da DP, sua

excessiva produção pode ser importante para hiper-inflamação associada à periodontite (Ishikawa, 2007). Chapple e Matthews (2006) sugeriram que esse estresse oxidativo não só permite um dano tecidual direto, mas também ativa a transcrição de fatores nucleares chave como RANKL, que podem induzir transcrição gênica de outros mediadores pró-inflamatórios.

Entre os fatores ambientais conhecidos por afetar a progressão da DP está o fumo, como um dos principais fatores de risco para periodontite. O fumo aumenta o risco de destruição periodontal pela estimulação de uma resposta inflamatória e prejudicando a resposta protetora/reparadora do hospedeiro (Ishikawa, 2007). A diabetes também têm sido estudado como fator de risco para DP. Sabe-se que indivíduos diabéticos respondem de maneira exagerada ao desafio microbiano do biofilme comparado aos não diabéticos e é essa resposta inflamatória exagerada nos diabéticos que parece capaz de aumentar o risco para desordens vasculares. Uma hiperglicemia por longo tempo pode suportar uma infecção anaeróbica em sítios periodontais devido à exacerbada resposta imune inata. A hiperglicemia persistente pode levar a ativação crônica da resposta imune inata e a inflamação crônica do periodonto por causar o bloqueio ou supressão dos caminhos para a resolução da inflamação. O papel da resposta inata, inflamação e resolução da inflamação foram considerados essenciais para as complicações que ocorrem na diabetes, incluindo a DP (Nassar et al., 2006). Nishimura e colaboradores (2006) estudaram a relação bidirecional que existe entre DP e diabetes e a periodontite foi considerada a sexta complicação da diabete.

Saito & Shimazaki (2006) sugeriram que a obesidade está associada com a DP. A obesidade aumenta o risco para várias doenças sistêmicas e aumenta mortalidade dos pacientes. A DP pode influenciar nos níveis séricos de glicose, não somente nos diabéticos mas também nos indivíduos não diabéticos. Essa relação entre obesidade, diabetes e DP é complexa e precisa ser mais profundamente analisada. Sabe-se que a influência da DP nas desordens metabólicas da obesidade, como metabolismo de glicose e lipídios, e associação da tolerância à glicose é destacada.

Essas informações sobre a resposta do hospedeiro e fatores que podem modular a periodontite podem ser usadas para novas propostas terapêuticas. Com mudança do paradigma, o foco na DP mudou de diagnóstico e tratamento para prevenção e promoção de saúde. Identificar e administrar os fatores de risco para periodontite é muito importante, fatores ambientais como fumo e diabetes podem ser significativamente reduzidos ou eliminados pela cessação do fumo e pelo controle metabólico, respectivamente (Ishikawa, 2007).

Além disso, Kirkwood e colaboradores (2006) sugeriram nova opção terapêutica para a DP. A perda óssea alveolar pode ser retardada ou prevenida com o uso de agentes que podem modular a resposta do hospedeiro, sendo a inibição ou bloqueio das enzimas proteolíticas e das citocinas pró-inflamatórias um exemplo. Esses autores mencionaram três categorias de agentes que podem modular a resposta do hospedeiro: antiproteínases, drogas antiinflamatórias e drogas relacionadas com o metabolismo ósseo. Finalmente eles consideraram uma nova estratégia com uma proteína antagonista para a DP, para quebrar a ligação entre RANK/RANKL/OPG, a qual pode ser mais efetiva para o controle da DP.

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo foi avaliar em ratos a influência da inoculação da bactéria *P. gingivalis* na progressão da DP induzida por ligadura por meio de análises histológicas e imunológicas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 45 ratos adultos machos do tipo Wistar, com idade aproximada de 10 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo (Cemib) da Universidade Estadual de Campinas. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da Unicamp – Cemib sob o protocolo número 1573-1.

4.2 Cepas bacterianas

Para o estudo utilizamos a cepa de referência patogêna em modelo animal *P. gingivalis* W83 (Nelson, 2003). A partir dos estoques congelados a -20°C , as células bacterianas foram cultivadas a 37°C em meio Agar sangue sob atmosfera de ausência de oxigênio (80% N_2 , 10% CO_2 , 10% H_2) (MiniMACS anaerobic Workstation, don Whitley Scientific, UK). Após 72 horas de crescimento em Agar, colônias isoladas de *P. gingivalis* foram selecionadas e transferidas a tubos contendo 25ml de caldo BHI suplementado com 250ul de solução estoque de menadiona e com 250ul de solução estoque de hemina, até uma absorbância *starter* de aproximadamente 0,050 (550nm). A cultura foi mantida nas mesmas condições de crescimento anterior. Após 18h de cultivo, correspondente a fase log de crescimento de *P. gingivalis*, 1×10^{10} células foram centrifugadas, lavadas rapidamente em solução de PBS estéril reduzido e ressuspensas em 1ml de solução de 2% carboximetilcelulose em tampão PBS reduzido estéreis (veículo). A solução inóculo foi utilizada imediatamente após o preparo.

4.3 Desenho experimental

Os 45 animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: 1- Controle (n=15); 2- DP induzida por ligadura (n=15) e 3- DP induzida por ligadura + inoculação de *P. gingivalis* (n=15), nos grupos 2 e 3 os animais foram divididos em subgrupos de cinco animais com três períodos diferentes de sacrifício (15, 21 e 30

dias). Foi administrado antibiótico Bactrim 20 mL (Roche®, Laboratórios Roche, São Paulo, Brasil) para 1 litro de água filtrada por sete dias apenas para os animais do grupo 3 para diminuir o número ou eliminar as bactérias da microbiota original. Os animais permaneceram três dias sem antibiótico antes do início da fase experimental. No dia 0 foi realizado um esfregaço pré-inoculatório com Swab estéril (SWAB) (Figura 1) para confirmar a ação do antibiótico por meio da técnica de PCR convencional com *primers* 16S e *P. gingivalis* (Machion et al., 2004; Saito et al., 2006) (Figuras 2 e 3). Os animais foram inicialmente pesados para que se calculasse a correta dosagem do anestésico a ser administrado. A sedação foi realizada por meio de injeção intramuscular de 50mg/kg de Ketamina (Francotar, Laboratório Vibrac, Roseira, Brasil). Após anestesia os animais dos grupos 2 e 3 foram posicionados em aparato de Doku modificado (Doku, 1966). A boca do animal foi mantida aberta por meio de bandas elásticas presas aos incisivos inferiores e a língua afastada com auxílio de fio de algodão. Foi colocada uma ligadura de fio de algodão (Corrente Algodão nº10; Coats Corrente, SP, Brasil) pelo espaço interproximal, ao redor do 1º molar inferior ao nível do sulco gengival, bilateralmente, de acordo com a técnica descrita por Johnson (1975). A inoculação de *P. gingivalis* foi realizada nos animais do grupo 3, após a colocação da ligadura, nos dias 0, 1 e 3 com as colônias de bactéria *P. gingivalis* ressuspensas em 2% carboximetilcelulose estéril utilizado como veículo (Figura 4). Para o grupo 3, foram inoculados 100ul contendo 1×10^9 com auxílio de micropipeta e ponteira estéril. Os grupos 1 e 2 (sem inoculação) receberam apenas 100ul de solução 2% carboximetilcelulose estéril. Em adição a esse protocolo de inoculação, cada gaiola do grupo que foi inoculado recebeu duas placas de petri contendo agar sangue saturadas com colônias de *P. gingivalis*, o qual foi utilizado como veículo para a inoculação adicional. Os animais dos diferentes grupos foram mantidos sob as mesmas condições ambientais por 15, 21 e 30 dias, no biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-Unicamp, em gaiolas plásticas, com cinco animais em cada uma delas, alimentados com ração Labina (Purina®, Nestlé Brasil LTDA, São Paulo, Brasil) e água “*ad libitum*”.



Figura 1: Coleta do esfregaço pré-inoculatório para confirmar a ação do antibiótico na redução ou eliminação das bactérias da flora original dos animais do grupo 3 com SWAB estéril.

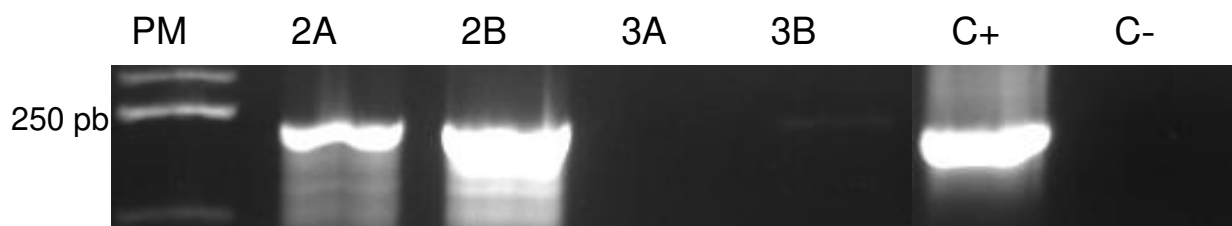


Figura 2: Gel de agarose 1,6% com amostras da reação de PCR convencional com *primer* 16S para confirmação da ação do antibiótico administrado aos grupos 2 e 3.

PM: peso molecular

2A e 2B: animais A e B do grupo 2

3A e 3B: animais A e B do grupo 3

Primer: ACGGCTACCTTGTTACGACTT
AGAGTTTGATCCTGGCTCAG

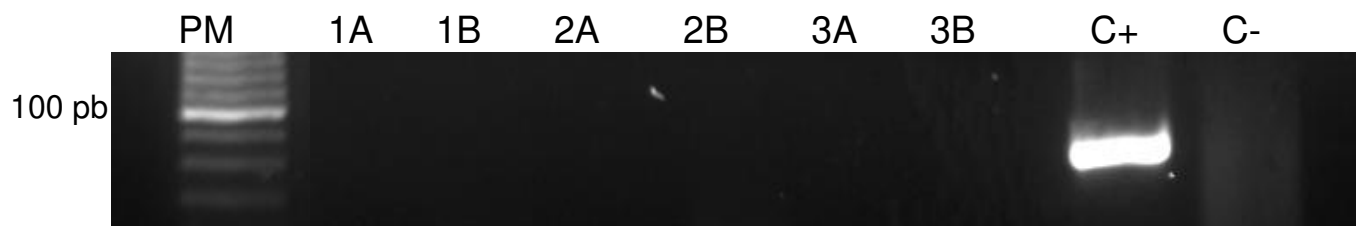


Figura 3: Gel de agarose 1,6% com amostras da reação de PCR convencional com *primer P. gingivalis* para confirmação a ausência da bactéria *P. gingivalis* nos grupos 1, 2 e 3.

PM: Peso molecular

1A e 1B: animais A e B do grupo 1

2A e 2B: animais A e B do grupo 2

3Ae 3B: animais A e B do grupo 3

Primer: AGGCAGCTTGCCATACTGCG

ACTGTTAGCAACTACCGATGT

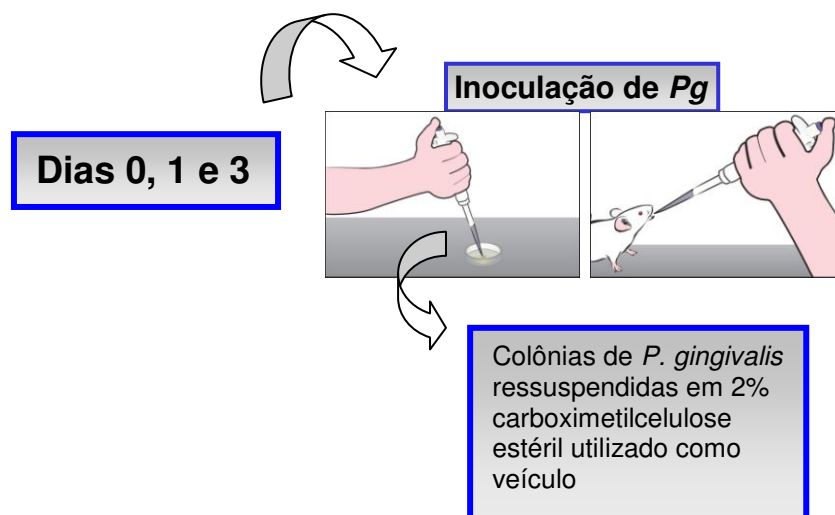


Figura 4: Esquema para inoculação de *P. gingivalis* realizada nos dias 0, 1 e 3. Foram inoculados 100ul contendo 1×10^9 com auxílio de micropipeta e ponteira estéril. Os grupos 1 e 2 (sem inoculação) receberam apenas 100ul de solução 2% carboximetilcelulose estéril.

4.4 Coleta das amostras

Ao final de cada período experimental (15, 21 e 30 dias) o SWAB foi novamente coletado (Figura 1) e armazenado em eppendorf contendo 500 mL de PBS, levado ao vórtex por 15 segundos + 15 segundos. Retirou-se o Swab e novamente agitou-se por 5 segundos sendo a solução armazenada à -20°C para posterior análise. O mesmo foi feito para as ligaduras dos animais dos grupos 2 e 3.

Os animais foram sacrificados por meio de decaptação. Após o sacrifício, as ligaduras foram coletadas e armazenadas de acordo com os passos descritos acima para o SWAB. A gengiva marginal dos 1° molares inferiores foi coletada, lavada em solução salina e armazenada em RNALater® (Ambion Inc., Austin, TX, USA) a -70°C. As mandíbulas foram removidas e armazenadas em formaldeído 4% pH 7,0 (Proderma, Piracicaba, Brasil) nas primeiras 48 horas e processadas histometricamente. Os seguintes parâmetros foram avaliados: perda óssea por meio de histometria e expressão dos genes IL-1b, IL-1ra, IL-6, IL-10, RANKL e OPG por meio de técnica de PCR em tempo real.

4.5 Processamento Histológico

As mandíbulas foram dissecadas e divididas pela sínfise em hemi-mandíbulas, mantendo os tecidos moles da região do dente que recebeu a ligadura. Foi feita descalcificação com EDTA 10%, pH=7,0 (Chemco Ind e Com LTDA, Campinas, Brasil) por 45 dias, com trocas diárias em temperatura ambiente. Após inclusão em paraplast (McCormick Scientific, LLC, St Louis, EUA) cortes seriados de 6µm foram obtidos no sentido méso-distal e corados com hematoxilina e eosina.

4.6 Procedimentos para a análise de expressão gênica

4.6.1 Extração de DNA

As amostras acondicionadas a -20°C foram descongeladas e submetidas a um banho de fervura por 10 minutos (Millar et al. 2000). Após a lise celular, as amostras foram centrifugadas (10.000 rpm/10 seg) e o sobrenadante contendo o

DNA em solução foi transferido para um novo tubo. As amostras de DNA foram conservadas a -20°C, para utilização nos experimentos de PCR convencional.

4.6.2 Extração de RNA total

A extração de RNA total das amostras de gengiva foi realizada utilizando-se o reagente Trizol® (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O pellet de RNA foi ressuspendido em água tratada com diethylpirocarbonato e armazenado a -70°C. A concentração do RNA foi determinada por densidade ótica por meio do Biophotometer (Eppendorff AG, Hamburg, Germany). As amostras foram quantitativamente analisadas para a expressão dos genes IL-1b, IL-1ra, IL-6, IL-10, RANKL e OPG, utilizando o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gapdh) como gene de referência para a reação de PCR em tempo real.

4.7 Análise Histométrica

A área de perda óssea interradicular (APO) na região de bifurcação foi obtida por meio da contagem de pontos em um retículo de quadrados de 0,01mm². Para estimativa da área foram selecionados 10 cortes eqüidistantes para cada dente. Utilizando-se um sistema de pontos de um retículo quadriculado do programa Image Pro® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), foi mensurada a área de tecido conjuntivo proveniente da destruição óssea na região de bifurcação (grupos 2 e 3) ou a área do ligamento periodontal (grupo 1) por único examinador cego. O retículo foi posicionado de maneira que sempre incluísse dentina coronária e radicular e tecido ósseo, sendo computados os pontos que coincidiam com o tecido conjuntivo presente na região de bifurcação em consequência da perda de inserção periodontal.

4.8 PCR convencional

Com objetivo de se determinar a presença ou não de bactérias e da *P. gingivalis* utilizada a técnica de PCR convencional a partir do DNA extraído das amostras de ligadura e SWAB. Primeiramente foi realizada a reação de PCR com pares de *primer* universal para 16S (tabela 1), para avaliar a presença de DNA bacteriano espécie-inespecífico. A seguir, reações foram realizadas com pares de *primer* específicos *P. gingivalis* (tabela 1) para detectar sua presença nas amostras e comprovar o sucesso da inoculação. A reação de PCR foi processada em 25µL de uma mistura de reagentes contendo 2.5µL solução tampão (10X Reaction Buffer Taq Polymerase, INVITROGEN® - Life Technology do Brasil), 1,25µL de MgCl₂, 0,5µL de dNTP, 0,75 µL de cada *primer*, 0,125 de Taq DNA Polymerase (5u/ul, INVITROGEN) e água ultrapura para completar 20µL, preparados sob forma de *mastermix*. Para as reações com pares de *primer* para *P. gingivalis*, uma alíquota de 5µL de cada amostra de DNA foi individualmente adicionada em microtubos de 200ul. Para as reações com pares de *primer* para o gene 16S, uma alíquota de 3µL de cada amostra de DNA mais 2ul de H₂O foram individualmente adicionados em microtubos de 200ul.

Além das amostras, em cada rodada de reação de PCR, foram utilizados controles positivos e negativos, que passaram pelo mesmo método de extração de DNA. Para 16S, foi utilizado fluído de bolsa periodontal coletado com cone de papel, mergulhado em solução de PBS. Para as reações para *P. gingivalis*, foi utilizado um swab mergulhado na solução inoculatória (item 4.2) armazenado em PBS. Como controle negativo, utilizou-se água ultrapura.

A mistura foi submetida a um aparelho termociclador convencional (GeneAmp PCR System 2400 – Perkin Elmer), com o *primer* para 16S de acordo com as seguintes condições térmicas: 36 ciclos de desnaturação do DNA a 95°C por 5 minutos, 94°C por 60 segundos, 47°C por 30 segundos, 72°C por 120 segundos, 72°C por 10 minutos e -3°C por tempo indeterminado. Para o *primer* da *P. gingivalis* foram seguidas as seguintes condições: 38 ciclos de desnaturação do DNA a 95°C por 5 minutos, 94°C por 45 segundos, 54°C por 60 segundos, 72°C por 60 segundos, 72°C por 5 minutos e -3°C por tempo indeterminado. Os

produtos de PCR foram analisados imediatamente ou armazenados em freezer a -20°C.

O total de 10uL de cada reação de PCR foram submetidos a separação eletroforética em gel de agarose 1,6% adicionado de 0,15ug/mL de brometo de etídio, em voltagem constante de 5volts/cm, durante 30 minutos, na presença de tampão TBE (45mM Tris, 45mM ácido bórico e 0,1 mM EDTA). Após o término da eletroforese, os géis foram documentados sob luz UV em sistema digital de captura de imagens, sob condições padronizadas.

4.10 Reação de PCR em tempo real

4.10.1 Transcrição reversa: O RNA total foi tratado com DNase (Turbo DNA-free, ® Ambion Inc., Austin, TX, USA) para a remoção de qualquer resíduo de DNA genômico e 1µg foi utilizado para síntese de cDNA. A reação foi carregada utilizando-se o “first-strand” kit de síntese de cDNA (Ligth Cycler, ® Roche Diagnostics Co., Indianápolis, IN, USA) seguindo as instruções do fabricante.

4.10.2 Desenho do *primer*: Os *primers* foram desenhados utilizando-se um software de desenho de sondas (LigthCycler,® Roche Diagnostics Co., Indianápolis, IN, USA).

4.10.3 Reação de PCR em tempo real: PCR foi realizado com o sistema Sybergreen (LigthCycler,® Roche Diagnostics Co., Indianápolis, IN, USA). O produto da reação foi quantificado utilizando um software (LigthCycler,® Roche Diagnostics Co., Indianápolis, IN, USA), com Gapdh como gene de referência. Para cada uma das “corridas”, a água foi utilizada como controle negativo, e o produto das reações foi quantificado utilizando-se o programa do próprio fabricante (LightCycler Relative Quantification Software - Roche Diagnostics GmbH). As reações de PCR em tempo real foram realizadas sob condições térmicas específicas para cada gene, como demonstradas na tabela a seguir (tabela1).

Tabela1: Seqüência de *primers* para os genes estudados com reações de PCR. Primers 16S e *P. gingivalis* com PCR convencional e IL-1 β , IL-1ra, IL-6, IL-10, RANKL e OPG com PCR em tempo real.

Genes	Sequência 5'→ 3'
GAPDH	GCCTTCTCTTGTGACAAAGTG TGGTGATGGGTTTCCCG
IL-1 β	TGTGGATCCCAAACAATACCC TAGGAAGACAGGTCTGTGCTC
IL-1ra	CCTGCAAGATGCAAGCC AACCACATTCCGAAAGTCCAATAGG
IL-6	GAGAAGTTAGAGTCACAGAAGGAG TTTAGATACCCATCGACAGGATATATT
IL-10	CCTCTGGATACAGCTGCGA TGTCACGTAGGCTTCTATGC
RANKL	AGCGCTTCTCAGGAGTT TACCAAGAGGACAGACTGACTTTA
OPG	AGTGAAGATAAGCTGCTTATAGTTAGG GCTGGAGGATCTTCATTCCC

Abreviações: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gapdh), Interleucina-1 beta (IL-1b), Interleucina-1 receptor antagonista (IL-1ra), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), ligante do receptor ativador do fator κ B nuclear (RANKL) e osteoprotegerina (OPG).

Além disso, foram definidas previamente no laboratório condições ideais de corrida para cada gene, incluindo a concentração, número de ciclos, temperatura de anelamento e extensão. Essas condições também são denominadas *setup* e estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Dados dos primers utilizados na reação de PCR em tempo real para cada gene. Concentração dos primers, número de ciclos utilizados, temperatura de anelamento e extensão de cada gene.

Gene	Concentração	Nº de ciclos	Anelamento	Extensão
RankL	0,5µM	40	55°C/5 seg	72°C/6 seg
OPG	1µM	40	55°C/5 seg	72°C/6 seg
IL-1b	0,5 µM	40	55°C/3 seg	72°C/6 seg
IL-1ra	0,75 µM	40	55°C/3 seg	72°C/6 seg
IL-6	0,75 µM	40	55°C/5 seg	72°C/8 seg
IL-10	0,5 µM	40	55°C/3 seg	72°C/6 seg

Abreviações: ligante do receptor ativador do fator kB nuclear (RANKL) e osteoprotegerina (OPG), Interleucina-1 beta (IL-1b), Interleucina-1 receptor antagonista (IL-1ra), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10).

4.9 Análise estatística

Foi utilizado o teste Anova um critério para identificar se havia diferença intragrupo para os grupos 1, 2 e 3 para as avaliações histométricas e de expressão gênica e em todos os períodos do estudo. O Método de Student-Newman-Keuls foi utilizado para identificar onde estavam as diferenças intragrupos encontradas pelo Anova comparando os diferentes períodos de cada grupo. Foi utilizado também o teste T para identificar as diferenças intergrupos em cada período estudado. Todos os testes foram realizados com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Histometria: Na análise intergrupo os dados mostraram uma APO significativamente maior ($p < 0,001$) para o grupo com ligadura (grupo 2) quando comparado tanto ao grupo de ligadura + *P. gingivalis* (grupo 3) quanto ao controle (grupo 1), $2,40 \pm 0,33$; $1,40 \pm 0,29$; $0,01 \pm 0,0016$, respectivamente. Em relação às análises intragrupo, no grupo com ligadura não foi observada diferença estatisticamente significativa na APO nos diferentes períodos ($p = 0,001$), já no grupo com ligadura + *P. gingivalis* diferença estatisticamente significativa foi encontrada no período de 30 dias ($p < 0,001$). O controle (grupo um) diferiu significativamente dos outros grupos em todos os períodos ($p < 0,001$). (Figura 5 e 6) .

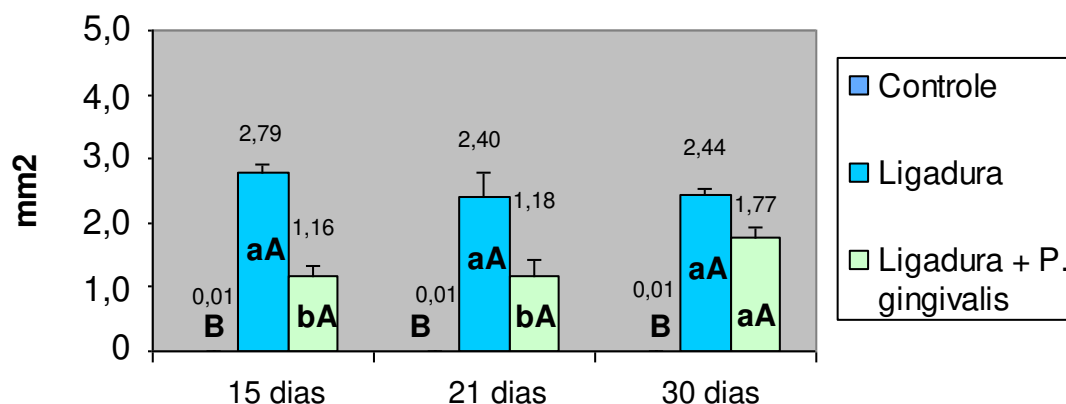


Figura 5: resultados da análise histométrica da APO para os grupos 2 e 3 em relação ao grupo 1 (controle) em todos os períodos do estudo.

Letras minúsculas representam diferenças intragrupos nos diferentes períodos estudados.

Letras maiúsculas representam diferenças intergrupos (grupos 2 e 3) em relação ao grupo controle.

Abreviações: Área de perda óssea interradicular (APO), milímetros quadrados (mm^2), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*).

Análise estatística: Anova one way para análises intragrupo e Método de Student-Newman-Keuls para análises intergrupos, $p < 0,050$ e $\alpha = 0,050$.

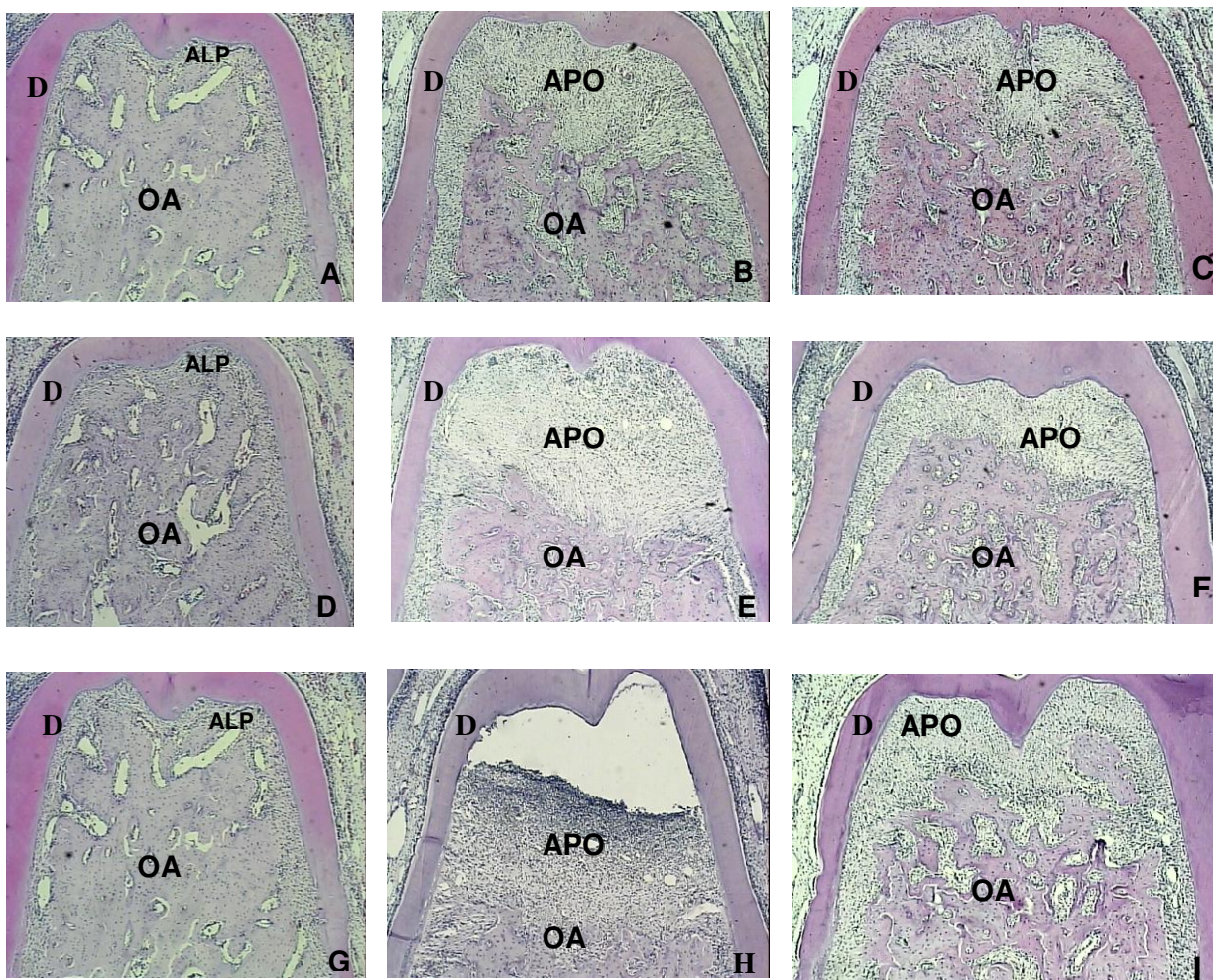


Figura 6: Fotomicrografias ilustrando a área de perda óssea na região de bifurcação de 1° molares. (A) grupo 1, (B) grupo 2 aos 15 dias, (C) grupo 3 aos 15 dias, (D) grupo 1, (E) grupo 2 aos 21 dias, (F) grupo 3 aos 21 dias, (G) grupo 1, (H) grupo 2 aos 30 dias e (I) grupo 3 aos 30 dias . ALP: área do ligamento periodontal; APO: área de perda óssea na região de bifurcação; OA: osso alveolar; D: dentina.

5.2 Análise da presença ou ausência de espécies bacterianas:

Microbiologicamente, reações de PCR positivas para o gene 16S permitiram determinar que os grupos 1, 2 e 3 apresentavam componente bacteriano na região dento-gengival (Figura 7). Em relação à *P. gingivalis* os grupos 1 e 2 apresentaram reações negativas, sendo que apenas no grupo 3 em todos os períodos observou-se a presença de *P. gingivalis*, comprovando o sucesso do procedimento de inoculação (Figura 8).

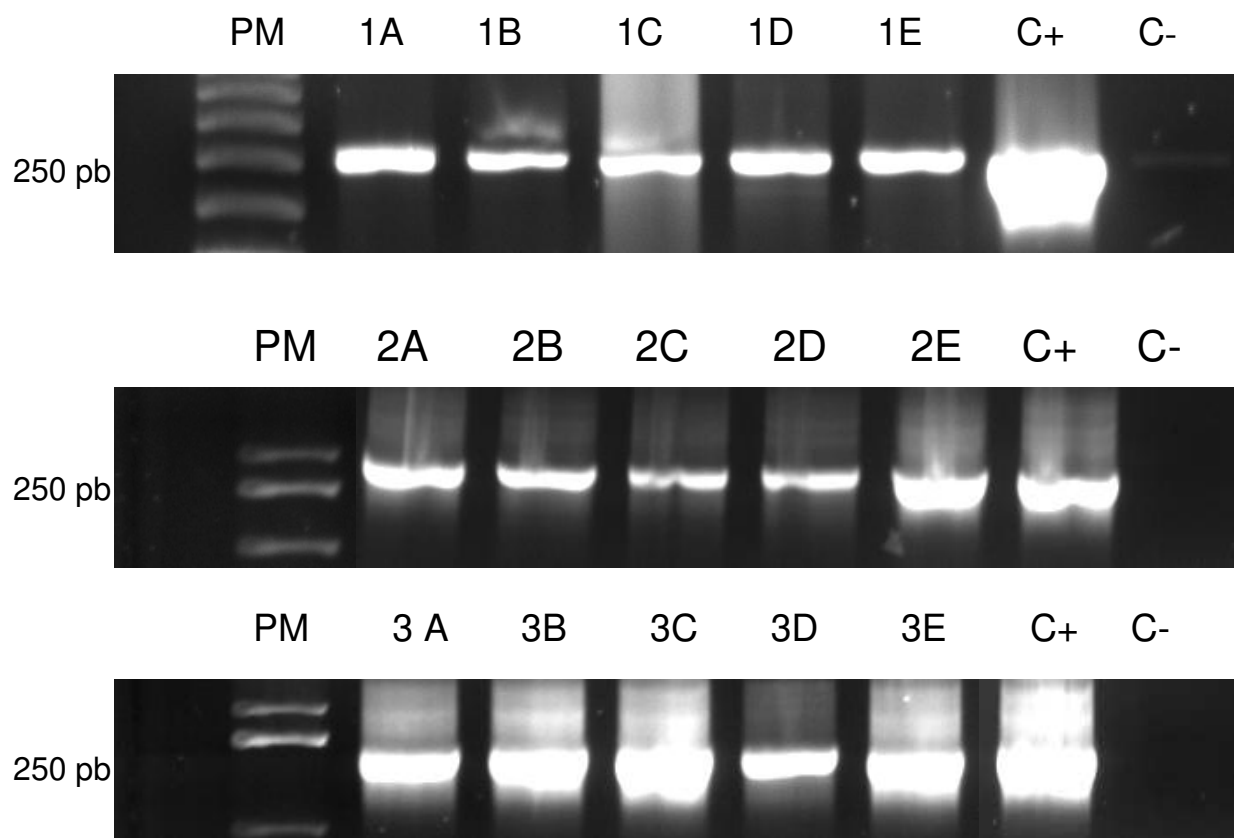


Figura 7: Gel de agarose 1,6% com amostras da reação de PCR convencional com *primer* 16S para os grupos 1, 2 e 3 confirmando a presença de bactérias nos animais desses grupos. Os resultados mostrados acima representam todos os animais de cada grupo, portanto pode-se concluir que todos os animais apresentaram reações positivas para o gene 16S.

PM: peso molecular

250 pb: peso molecular de 250 pares de bases correspondendo ao gene 16S

1A a 1E: animais do grupo 1; 2A a 2E: animais grupo 2; 3A a 3E: animais grupo 3

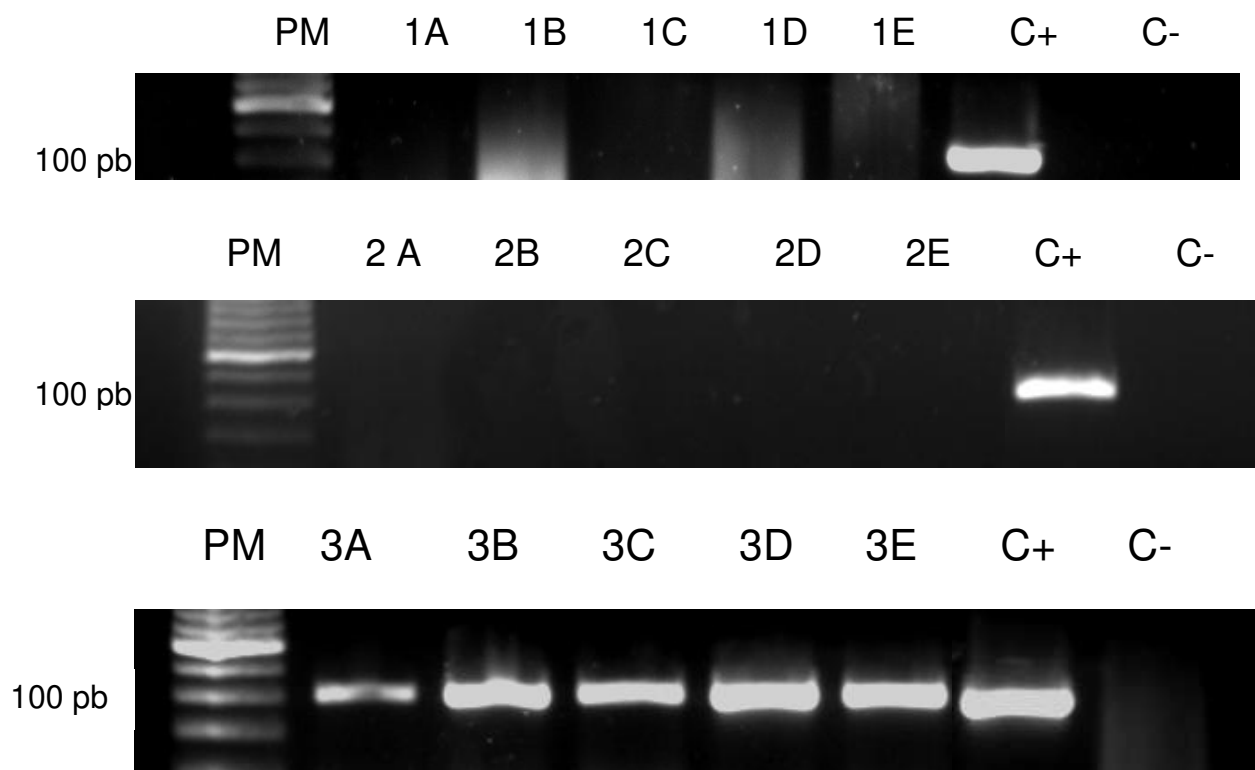


Figura 8: Gel de agarose 1,6% com amostras da reação de PCR convencional com *primer* *P. gingivalis* para grupos 1, 2 e 3 confirmando a ausência dessa bactéria na flora original dos animais dos grupos 1 e 2 e sua presença no grupo 3, que foi inoculado. Os resultados mostrados acima representam todos os animais de cada grupo. Portanto pode-se concluir que todos os animais dos grupos 1 e 2 foram negativos para o gene da *P. gingivalis* e todos os animais do grupo 3 foram positivos.

PM: peso molecular

100 pb: peso molecular de 100 pares de base correspondente ao gene da *P. gingivalis*

1A e 1E: animais do grupo 1; 2A e 2E: animais do grupo 2; 3A e 3E: animais do grupo 3

5.3 Análise da expressão gênica: Os níveis de RNAm no tecido gengival para todos os grupos estão apresentados relativos aos valores de Gapdh nos gráficos. As análises estatísticas foram realizadas relacionando os genes com ações antagonistas no organismo. As razões estudadas foram IL-1 β /IL-1ra, IL-6/IL-10 e RANKL/OPG. A análise da expressão dos genes demonstrou que a presença de *P. gingivalis* na região dento-gengival do grupo 3 promoveu um aumento significativo dos níveis de RNAm de fatores de proteção IL-1ra, IL-10 e OPG em relação as suas citocinas antagonistas no tecido gengival ao redor de ligaduras, quando comparados aos níveis dessas citocinas no grupo somente com ligadura (grupo 2).

Nas comparações da razão IL-1 β /IL-1ra, observamos que houve maior expressão da IL-1 β em todos os períodos estudados no grupo 2 com diferença estatisticamente significativa encontrada apenas para o período de 21 dias ($p=0,012$) no entanto houve uma tendência numérica de maior expressão dessa citocina nos períodos de 15 e 30 dias. No grupo 3, houve maior expressão da IL-1ra para todos os períodos estudados, sem diferença estatisticamente significativa entre eles ($p>0,05$). Essa expressão foi numericamente maior aos 15 dias, diminuiu um pouco aos 21 dias e voltou a aumentar numericamente aos 30 dias. Na comparação intergrupos para IL-1 β /IL-1ra, observamos diferenças estatisticamente significantes nos períodos de 15 e 21 dias apenas ($p=0,023$ e $p=0,044$, respectivamente), mas essa diferença significativa não se mantém aos 30 dias ($p=0,643$) (figura 9).

Na relação entre IL-6/IL-10, houve maior expressão da IL-6 em todos os períodos para o grupo 2, com diferença estatisticamente significativa para o período de 30 dias ($p=0,018$) quando comparado ao período de 15 dias. Para o grupo 3 observamos maior expressão da IL-10, com diferença estatisticamente significativa entre os períodos de 15, 21 e 30 dias ($p<0,05$). Essa expressão aumenta entre 15 e 21 dias e sofre queda aos 30 dias. Nas comparações intergrupos para IL-6/IL-10, observamos diferenças estatisticamente significante nos períodos de 15 e 30 ($p=0,020$ e $p=0,002$), no entanto essa diferença não foi encontrada aos 21 dias por haver uma tendência numérica de menor expressão

da IL-10 e conseqüente expressão maior da IL-6 no grupo 3 nesse período (figura 10).

Na relação de RANKL/OPG observamos uma razão inversa na expressão desses fatores osteoclásticos, enquanto RANKL aumenta no grupo 2, OPG aumenta no grupo 3. Houve maior da expressão de RANKL em todos os períodos no grupo 2, com diferença estatisticamente significativa para o período de 30 dias em relação ao período de 15 dias ($p<0,001$) e 21 dias ($p=0,003$). Para o grupo 3, observamos maior expressão de OPG em todos os períodos estudados, com diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) para os períodos de 15 dias em relação ao período de 30 dias ($p=0,005$). Na comparação intergrupos para RANKL/OPG, observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos períodos de 21 e 30 dias ($p=0,033$ e $p=0,004$, respectivamente), uma vez que no início (15 dias) há certo equilíbrio na razão RANKL/OPG entre os grupos 2 e 3 (figura 11).

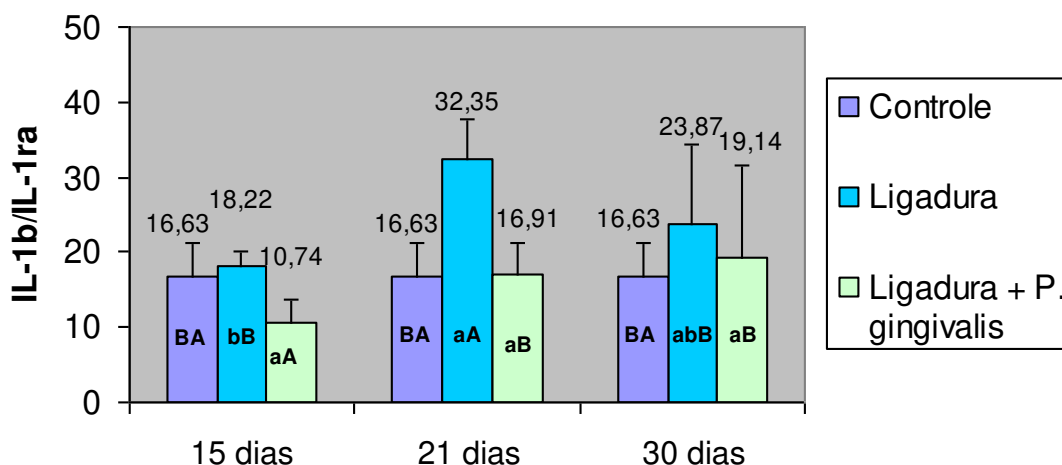


Figura 9: resultados da análise da expressão gênica da relação entre as citocinas IL-1 β /IL-1ra para os grupos 2 e 3 em relação ao grupo 1 (controle) em todos os períodos estudados. Letras minúsculas representam diferenças intragrupos nos diferentes períodos estudados. Letras maiúsculas representam diferenças intergrupos (grupos 2 e 3) em relação ao grupo controle.

Abreviações: Interleucina-1 β (IL-1 β), Interleucina-1ra (IL-1ra), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), RNA mensageiro (mRNA).

Análise estatística: Anova one way para análises intragrupo e Método de Student-Newman-Keuls para análises intergrupos, $p<0,050$ e $\alpha=0,050$.

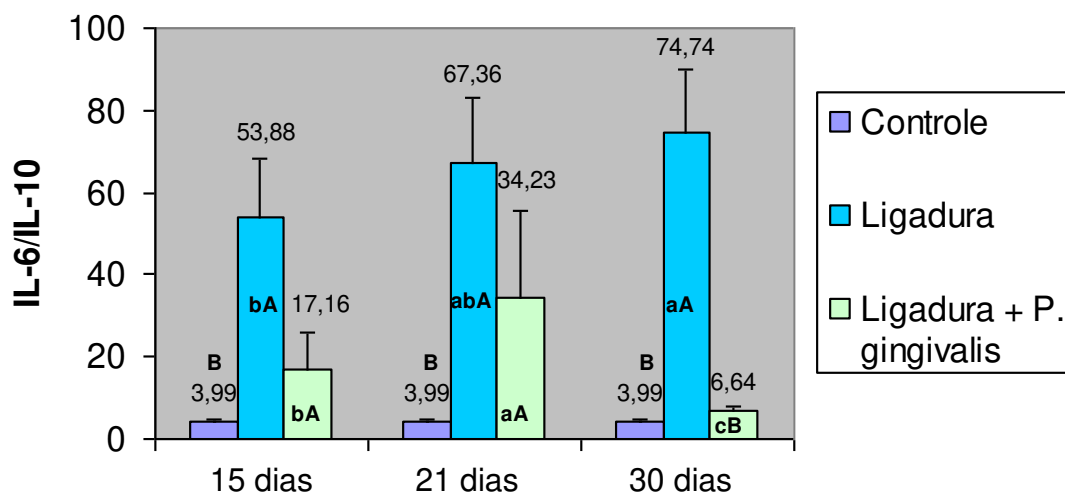


Figura 10: resultados da análise da expressão gênica da relação entre as citocinas IL-6/IL-10 para os grupos 2 e 3 em relação ao grupo 1 (controle) em todos os períodos estudados.

Letras minúsculas representam diferenças intragrupos nos diferentes períodos estudos.

Letras maiúsculas representam diferenças intergrupos (grupos 2 e 3) em relação ao grupo controle.

Abreviações: Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), RNA mensageiro (mRNA).

Análise estatística: Anova one way para análises intragrupo e Método de Student-Newman-Keuls para análises intergrupos, $p < 0,050$ e $\alpha = 0,050$.

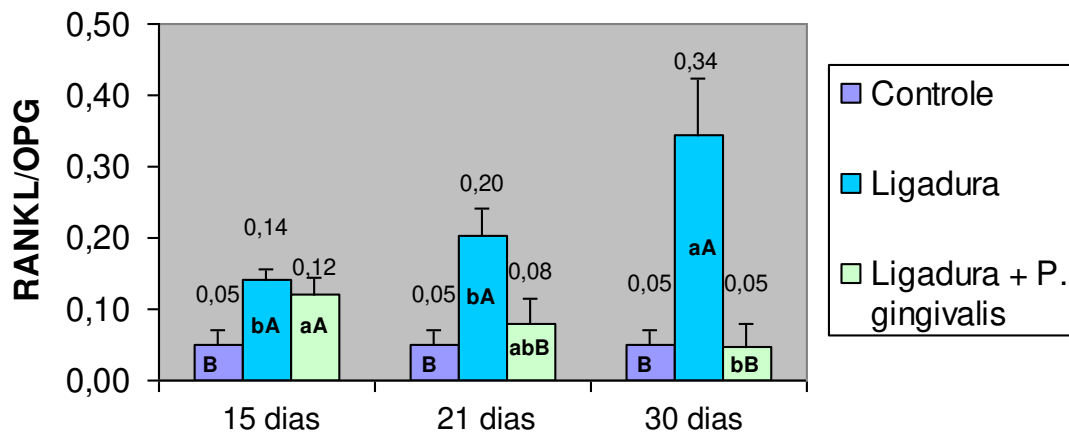


Figura 11: resultados da análise da expressão gênica da relação entre os fatores osteoclásticos RANKL/OPG para os grupos 2 e 3 em relação ao grupo 1 (controle) em todos os períodos estudados.

Letras minúsculas representam diferenças intragrupos nos diferentes períodos estudos.

Letras maiúsculas representam diferenças intergrupos (grupos 2 e 3) em relação ao grupo controle.

Abreviações: ligante do receptor ativador do fator κ B nuclear (RANKL) e osteoprotegerina (OPG), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), RNA mensageiro (mRNA).

Análise estatística: Anova one way para análises intragrupo e Método de Student-Newman-Keuls para análises intergrupos, $p < 0,050$ e $\alpha = 0,050$.

6. DISCUSSÃO

A DP é uma inflamação crônica dos tecidos dentais de suporte causada por uma complexa interação entre o sistema de defesa do hospedeiro e o biofilme dental (Herminajeng et al., 2001). *P. gingivalis* é o patógeno periodontal mais frequentemente isolado em pacientes com periodontite crônica quando comparado a pacientes saudáveis (van Steenberghe et al., 1991; Ishikawa et al., 1997). O objetivo desse estudo foi associar a doença periodontal induzida por ligadura com a inoculação de *P. gingivalis* e com isso tentar elucidar essa complexa interação entre hospedeiro e o desafio bacteriano do biofilme.

Modelos animais de indução de DP com a colocação de ligaduras de fio de algodão têm sido amplamente utilizados na literatura (Yoshinari et al., 1944; Rovin et al., 1966; Johnson, 1975; Page & Schroeder, 1982; Sallay et al., 1982; Sanavi et al., 1985; Klausen, 1991; Györfi et al., 1994; Koide et al., 1995; Pilatti & Sampaio, 1997). Esses estudos têm dado suporte para a hipótese do papel dos microrganismos na etiologia da DP. A partir de modelos animais mostrou-se que o uso de antibióticos e anti-sépticos podiam controlar a destruição de tecidos moles e duros diante de um desafio bacteriano (Mitchel & Johnson 1956; Shaw 1965; Keyes et al., 1966; Lindhe et al., 1970; Listgarten et al., 1979). Além disso, observou-se que a DP pode ser transmitida de um animal que abriga a doença para outro inicialmente saudável uma vez que os animais vivam no mesmo ambiente ou pela implantação do biofilme do animal doente ou da bactéria patogênica (Keyes & Jordan 1964; Dick & Shaw 1966). Essas bactérias poderiam ser “nativas” ou isoladas de bolsas periodontais humanas para ter capacidade de iniciar a destruição periodontal em diversos sistemas de modelo animal (Socransky et al., 1970; Irving et al., 1975, 1978 Lindhe). Os ratos são os animais usados com maior frequência. Esses modelos oferecem vantagens como baixo custo, fácil manuseio dos animais, facilidade em eliminar fatores interferentes (Galvão et al., 2003), avaliações microbiológicas e histológicas podem ser facilmente realizadas. Além disso, os aspectos clínicos, radiográficos e histológicos da DP em ratos são muito semelhantes àqueles em humanos, sendo que histologicamente algumas mudanças patológicas como ulceração, migração

apical do epitélio e o infiltrado inflamatório podem ser relacionados. Destruição das fibras colágenas e atividade osteoclástica também podem ser observadas (Page & Schroeder 1982; Klausen et al., 1991). O nosso estudo se baseou nas informações acima para selecionar o modelo animal de indução de doença periodontal com colocação de ligaduras.

No presente estudo a presença da ligadura foi eficiente em provocar inflamação gengival observada clinicamente e perda óssea alveolar observada histologicamente nos períodos de 15, 21 e 30 dias nos animais dos grupos com ligadura quando comparados ao grupo sem ligadura. Em relação aos grupos 2 e 3 observamos uma perda óssea maior para o grupo 2, evidenciando a progressão mais lenta da DP para o grupo 3. A presença da ligadura promove uma rápida colonização bacteriana associada a uma posição mais apical da margem gengival (Nyman et al., 1979; Weeks-Dybvig et al., 1982). A presença do biofilme dental e seus subprodutos induzem a produção de fatores locais pelas células imunes no tecido conjuntivo e células ósseas, como IL-1 α e β , IL-6 e PGE₂ e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) entre outros mediadores inflamatórios os quais modificam o equilíbrio da remodelação óssea tanto *in vivo* quanto *in vitro*, aumentando a formação e ativação osteoclástica bem como inibindo a função osteoblástica, o que consequentemente leva à destruição do tecido conjuntivo e reabsorção óssea (Schwartz et al., 1997). de Lima e colaboradores (2001) mostraram que essa inter-relação entre os patógenos periodontais do biofilme e o hospedeiro é responsável pela amplificação e progressão de uma resposta inflamatória levando o hospedeiro a produzir mediadores inflamatórios em resposta às bactérias e seus produtos metabólicos. Os leucócitos do hospedeiro são ativados por esses mediadores e são capazes de suprimir essa infecção bacteriana se houver um equilíbrio entre hospedeiro-bactéria. No entanto, se esse equilíbrio for perdido pode haver super-expressão de citocinas que poderão causar danos teciduais ao hospedeiro. Muitos mediadores do hospedeiro podem levar a destruição tecidual como ocorre na periodontite, entre eles estão as citocinas pró-inflamatórias. Embora os leucócitos sejam sua principal fonte, muitos outros tipos de células podem produzi-las.

No entanto, a inoculação da *P. gingivalis* foi capaz de alterar o modelo de indução de DP pela colocação de ligaduras, causando menor perda óssea alveolar e diferente perfil de expressão das citocinas pró e antiinflamatórias e dos fatores pró e anti-osteoclásticos no grupo inoculado (grupo 3). Isso pode ter ocorrido devido à presença dos fatores de virulências associados a *P. gingivalis* os quais são componentes da bactéria que, quando presentes, causam dano ao hospedeiro, mas quando ausentes impedem essa habilidade (Poulin & Combes, 1999). Esses fatores desempenham algumas funções como a habilidade de induzir interações bactéria-hospedeiro, habilidade de invadir o hospedeiro, habilidade de crescer em uma célula e as habilidades de escapar ou interferir com os mecanismos de defesa do hospedeiro (Holt & Ebersole, 2007). Kobayashi-Sakamoto e colaboradores (2003) mostraram que a *P. gingivalis* pode interferir com o funcionamento da rede de citocinas necessárias para manter a saúde periodontal. O organismo é capaz de alterar a secreção e o acúmulo de quimiocinas selecionadas, interferindo com a secreção da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e interleucina-8 (IL-8) pelas células mononucleares da circulação periférica. Essa alteração no perfil de secreção das citocinas é realizada pela ação das diversas proteinases da *P. gingivalis*, entre elas as gingipaínas, e interfere no recrutamento e a migração dos PMN por meio do endotélio e deve contribuir para o retardamento da resposta imune do hospedeiro, o que resulta em periodontite ativa. Os baixos níveis de quimiocinas devem interferir na habilidade do hospedeiro em reconhecer essas espécies bacterianas invasoras e direcionar os PMN para removê-las. Portanto as proteinases de *P. gingivalis* são consideradas fatores importantes de virulência na progressão da DP (Holt & Ebersole, 2007).

Com o objetivo de identificar uma possível alteração na expressão das citocinas pelo hospedeiro que justificasse a progressão mais lenta da DP para o grupo que recebeu a inoculação da *P. gingivalis*, esse estudo avaliou também a relação entre as citocinas com funções opostas no hospedeiro, ou seja, citocinas pró e antiinflamatórias IL-1 β /IL-1ra, IL-6/IL-10 e pró e anti-osteoclásticas como RANKL/OPG, por meio de reação de PCR em tempo real.

Primeiramente foi analisada a expressão da IL-1 e seu receptor antagonista, a IL-1ra, durante a progressão da DP induzida em ratos. No grupo 2, que recebeu apenas a colocação de ligaduras para induzir a DP, observamos na relação IL-1/IL-1ra maior expressão da IL-1 durante todos os períodos estudados, mas com diferença estatística apenas no período de 21 dias. Entretanto, no grupo 3, que recebeu ligadura e inoculação de *P. gingivalis* para indução de DP, foi observado maior expressão de IL-1ra em relação a IL-1, sem diferença estatisticamente significativa entre os períodos.

Uma explicação para a diferente expressão dessas citocinas entre os grupos 2 e 3 é que a presença da *P. gingivalis* com seus diferentes fatores de virulência de alguma forma pode ter alterado a diferenciação e atividade de células e quimiocinas que participam da resposta imune inflamatória, favorecendo uma resposta antiinflamatória para o grupo 3 e uma resposta mais destrutiva para o grupo 2. Pode-se sugerir que o grupo 2 apresentou uma esse tipo de resposta, uma vez que a IL-1 é uma citocina pró-inflamatória produzida por vários tipos de células incluindo macrófagos no tecido gengival afetado pela periodontite (Gery & Waksman, 1972; Kurt-Jones et al., 1985; McFarlane et al., 1990), por fibroblastos (Takada et al., 1991; Iribe et al., 1983) queratinócitos (Kupper et al., 1986) e células endoteliais (Miossec et al., 1986). Ela está presente em duas formas, IL-1(α e β), com pequena homologia entre elas, no entanto ambas podem se ligar aos dois tipos de receptores existentes para desencadear seu papel no processo inflamatório. O receptor tipo-1 (IL-1RI) é responsável pelas ações fisiológicas da IL-1, enquanto que o receptor tipo-2 (IL-1RII) age como “isca” para se ligar a IL-1 sem traduzir nenhum sinal (Collota et al., 1993). Um terceiro ligante da família da IL-1 é o receptor antagonista (IL-1ra) que se liga aos receptores da IL-1 sem desencadear nenhuma resposta biológica, agindo como inibidor competitivo da atividade da IL-1 (Dinarello, 1996). Entre suas ações biológicas podemos citar que a IL-1 desempenha diversas funções nos processos inflamatórios, contribuindo para diversos eventos essenciais para o início da resposta inflamatória (Ridderstad et al., 1991; Stashenko et al., 1987), como a ativação da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) responsável por alterações nos tecidos periodontais de

suporte e perda óssea alveolar. DeLima e colaboradores (2001) propuseram que a atividade da IL-1 em resposta aos lipopolissacarídeos (LPS) dos periodontopatógenos leva a super-expressão da COX-2, sustentando e/ou amplificando a resposta inflamatória no tecido gengival e levando a destruição do periodonto. A IL-1 também pode induzir uma hiper-regulação das moléculas de adesão nos leucócitos e células endoteliais e estimular a produção de quimiocinas o que são eventos críticos no processo de recrutamento dos leucócitos circulantes que participam da resposta inflamatória (Graves & Jiang, 1995, Penberthy et al., 1997), pode induzir a expressão de outros mediadores que amplificam ou sustentam a resposta inflamatória como as prostaglandinas (PG) (Tatakis et al., 1988; Ikeda et al., 1988) produção de enzimas líticas como a collagenase pelos fibroblastos gengivais, produção de IL-6 pelos osteoblastos (Ishimi et al., 1990; Linkhart et al., 1991; Lacey et al., 1993) e aumenta a atividade fagocítica (Dinarello, 1996). A produção de PG e IL-6 pelos osteoblastos contribui com a destruição do osso alveolar (Page, 1991; Akatsu et al., 1991; Manolagas & Jilka, 1992). Entre as PGs, a produzida em maior quantidade é a prostaglandina E₂ (PGE₂), a qual afeta as células progenitoras de osteoclastos e promove sua diferenciação em osteoclastos (Morita et al., 1989), enquanto a IL-6 estimula a formação de células multinucleadas com características de osteoclastos (Ishimi et al., 1990; Meikle et al., 1986).

Pode-se considerar também que a IL-1 desempenha papéis importantes na patogênese da DP, tanto em relação ao metabolismo da reabsorção óssea como citado acima quanto na destruição dos tecidos moles. Clinicamente é relatada uma relação da IL-1 com as DPs devido ao elevado nível de transcrição dessa interleucina em humanos com inflamação gengival crônica (Matsuki et al., 1991) e a associação *in vitro* da expressão de seu RNAm. Com a intenção de prevenir a resposta inflamatória descontrolada que levaria a destruição tecidual, a atividade da IL-1 deve ser controlada. Isso é feito naturalmente pela elaboração e liberação de citocinas anti-inflamatórias ou citocinas antagonistas (Delima, et al., 2001). IL-10 e IL-4 são citocinas anti-inflamatórias que inibem a produção de IL-1 (Essner et al., 1989; De Waal Malefyt et al., 1991) e o IL-1ra compete com a IL-1 e impede

sua ligação com o receptor (Dinarello, 1996; Colotta et al., 1993), levando a inibição de diversos processos patológicos como artrite, choque séptico, inflamações dérmicas e doenças autoimunes (Weckemann & Alcocer-Varela, 1996; Stewart & Marsden 1995, Mullarkey et al., 1994; Mohler et al., 1993, Haak-Frendscho et al., 1994; Moreland et al., 1997). Assuma e colaboradores (1998) sugeriram que a inflamação presente na gengivite pode ter efeito protetor, desde que não ocorra hiperregulação de IL-1 através da ação dos seus inibidores. Para tentar comprovar essa hipótese eles induziram DP com colocação de ligadura e inoculação de *P. gingivalis* ao redor do 1º molar inferior de primatas não-humanos. O grupo teste recebeu injeção de receptor antagonista solúvel de IL-1 nas papilas interdentais dos 1º e 2º molares e o grupo controle recebeu injeção apenas com o veículo. Após seis semanas foi observada uma redução de 78% no recrutamento de células inflamatórias e de 67% no número de osteoclastos no grupo teste e consequentemente menor perda óssea para esse grupo. A partir desses resultados os autores concluíram que a IL-1 tem função importante no metabolismo ósseo e que uma hiper resposta do hospedeiro frente ao desafio bacteriano pode levar a destruição das estruturas de suporte do periodonto.

Outra relação estudada nesse trabalho foi da IL-6/IL-10 que são citocinas pró e antiinflamatórias respectivamente sendo, portanto a IL-10 é antagonista à ação da IL-6. Pode-se observar uma expressão crescente em todos os períodos para IL-6 no grupo 2, com diferença estatística para o período de 30 dias quando comparado ao período de 15 dias. Já no grupo 3 foi observado maior expressão da IL-10 com diferença estatisticamente significativa entre todos os períodos. O que ocorre numericamente é uma tendência de maior expressão nos períodos de 15 e 21 dias, o que não se mantém aos 30 dias. Esses resultados indicam que houve uma resposta mais destrutiva do hospedeiro na ausência da bactéria.

A expressão da IL-10 na relação IL-6/IL-10 foi estatisticamente menor no grupo 2 (ligadura), que apresentou progressão mais rápida da DP. Já para o grupo 3 (ligadura + inoculação) a expressão da IL-10 foi estatisticamente maior em todos os períodos do estudo, justificando a progressão mais lenta da doença periodontal nesse grupo.

Mais uma vez a presença da *P. gingivalis* e seus fatores de virulência alteraram o perfil de expressão das citocinas no processo inflamatório. A literatura tem demonstrado em diversos estudos uma alteração no padrão das respostas humoral e celular em resposta a *P. gingivalis* em pacientes com atividade de DP (Ebersole et al., 1987; Genco, 1992). Essa resposta imune é considerada adaptativa, ou seja, é mediada pela produção de anticorpos contra o antígeno apresentado, que no caso é a *P. gingivalis* e desempenha papel importante no controle da remodelação óssea (Baron et al., 1983; Gruber, 1991). Essa resposta imune leva a produção de células CD4+ pelos linfócitos T e são essas células que dão origem as citocinas que induzem reabsorção óssea como a IL-6 (Fujihashi et al., 1993). Fujihashi e colaboradores (1996) mostraram em seu estudo que células CD4+ de gengivas inflamadas de pacientes com periodontite expressavam RNAm para IL-6. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória com habilidade de induzir reabsorção óssea *in vitro* (Jilka et al., 1992; Miyata et al., 1997) e a sua deficiência pode prejudicar a resposta inflamatória (Kopf et al., 1994). Essa citocina tem um papel importante na patogênese da DP induzida pela *P. gingivalis*, uma vez que as fímbrias dessa bactéria estimulam as células mononucleares do sistema circulatório periférico e da gengiva inflamada de pacientes com periodontite a secretarem IL-6 *in vitro* (Ogawa et al., 1991; Fujihashi et al., 1993). A secreção da IL-6 *in vitro* também pode ser estimulada pelos LPS da *P. gingivalis* e ocorre a partir das células ósseas (Miyata et al., 1997) e pelos fibroblastos do ligamento periodontal. Poli e colaboradores (1994) mostraram que animais com deficiência de IL-6 estavam protegidos contra a perda óssea causada pela falta de estrógeno. Ukai e colaboradores (1996) mostraram que animais com deficiência de células T não apresentavam perda óssea após injeção de endotoxinas bacterianas no tecido gengival, enquanto que animais normais para célula T apresentaram perda óssea após a injeção das endotoxinas. Baker e colaboradores (1999) estudaram a progressão da DP induzida por colocação de ligadura e inoculação de *P. gingivalis* em animais normais e com deficiência de IL-6 (animais knockout). Esses autores encontraram como resultado menor perda óssea para os animais knockout

quando comparados aos animais normais, evidenciando a influencia da resposta imune e suas citocinas na progressão da DP.

A IL-10 é uma citocina produzida pelos três tipos de célula T (Th0, TH1, Th2), pelos monócitos, macrófagos, mastócitos, queratinócitos, mastócitos e células B (Howard et al., 1992). Está bem estabelecido na literatura o papel regulatório da IL-10 na resposta imune, ela inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias com IFN- γ , IL-6 e IL-8 (Hempel et al., 1995; Seitz et al., 1995). Dependendo do estágio de ativação celular, a IL-10 pode agir como inibidor ou estimulador do crescimento das células B (Itoh et al., 1995) e tem a capacidade de dar suporte para o crescimento de mastócitos e células T (Howard et al., 1992). Além disso, a IL-10 tem papel protetor contra o efeito das LPS *in vivo* (Leon et al., 1998). Pacientes com DP tem maior produção de IL-10 pelas células mononucleares da gengiva, células T e macrófagos quando comparados a pacientes saudáveis (Stein & Hendrix, 1996; Aramaki et al., 1998; Prabhu et al., 1996; Gemmel 1995). Yamazaki e colaboradores (1997) demonstraram que um aumento no nível de IL-10 era acompanhado por diminuição nos níveis de IFN- γ , que é uma molécula pró-inflamatória. Herminajeng e colaboradores (2001) realizaram um estudo com o objetivo de desvendar o papel *in vivo* da IL-10 na indução de resposta imune em abscessos cutâneos causados pela *P. gingivalis* em ratos. Para esse estudo a IL-10 foi bloqueada pela ação do anticorpo anti-IL-10 em animais imunizados com as LPS da *P. gingivalis*. Foi observado que o bloqueio da IL-10 elevou a resposta de hipersensibilidade do tipo tardia no hospedeiro, sugerindo que essa citocina pode diminuir a regulação desse tipo de resposta.

Como dito anteriormente, em adição a destruição de tecido mole a reabsorção do osso alveolar é um importante evento que ocorre na DP. Nesse estudo foi avaliada a relação entre os fatores pró e anti-osteoclásticos RANKL/OPG. Foi possível observar claramente a falta de equilíbrio na expressão de RANKL/OPG nos períodos de 21 e 30 dias nos grupos 2 e 3, justificando mais uma vez a progressão da doença periodontal. É possível observar também que os níveis de expressão desse sistema nos grupos 1 e 3 apresentam valores

semelhantes, podendo indicar uma das causas da progressão mais lenta da doença periodontal no grupo 3, que recebeu a ligadura + inoculação de *P. gingivalis* (ver gráfico da página 54). Enquanto a expressão de RANKL foi maior no grupo 2, a expressão de OPG foi maior no grupo 3.

Esses fatores são responsáveis pela integridade do tecido ósseo e essa integridade depende da manutenção de um delicado equilíbrio entre reabsorção óssea causada pelos osteoclastos e formação óssea pelos osteoblastos (Garlet et al., 2006). Existem algumas moléculas chaves para regulação do sistema de remodelação óssea como o receptor ativador do ligante do fator κ B nuclear (RANKL), seu receptor celular RANK e o receptor “isca” a osteoprotegerina (OPG). RANKL é o principal estimulador da diferenciação e ativação dos osteoclastos e seus efeitos são neutralizados pela OPG, que inibe a reabsorção óssea impedindo a ligação de RANKL-RANK (Katagiri & Takahashi, 2002). Entretanto, a reabsorção óssea não ocorre apenas por meio dessa ligação, ocorre também a indução da expressão da catepsina K, uma proteinase produzida pela ativação dos osteoclastos envolvida com a solubilização da matriz óssea (Teitelbaum 2000). Um desequilíbrio no sistema RANK pode ser fator etiológico para várias patologias envolvendo o tecido ósseo (Rodan & Martin 2000; Romas et al., 2002). A doença periodontal pode ser considerada uma desordem que envolve o tecido ósseo e um aumento nos níveis de RANKL nos tecidos doentes é observado. O equilíbrio, ou sua ausência, com a OPG pode determinar a severidade da doença periodontal (Crotti et al., 2003; Garlet et al., 2004; Liu et al., 2003; Mogi et al., 2004; Teng et al., 2000; Valverde et al., 2004; Garlet et al., 2006).

7. CONCLUSÃO

Dentro dos limites desse estudo podemos concluir que a inoculação do *P. gingivalis* alterou o modelo de indução de doença periodontal com a colocação de ligaduras, levando a uma progressão mais lenta da doença. Isso ocorreu por um favorecimento da expressão das citocinas anti-inflamatórias na presença do microrganismo periodontopatogênico, diferente do que aconteceu no grupo que não foi inoculado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AAP 1996 World Workshop in Periodontics. Lansdowne, Virginia, The American Academy of Periodontology, 1996.
2. Aduse-Opoku J, Muir J, Slaney JM, Rangarajan M, Curtis MA. Characterization, genetic analysis and expression of a protease antigen (PrpPI) of *Porphyromonas gingivalis* W50. Infect and Immun 1995; 63: 4744-4754.
3. Amano A. Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. J Periodontol 2003; 74: 90-96.
4. Amano A, Fujiwara T, Nagata H, Kuboniwa M, Shamar A, Sojar H, et al. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae mediate coaggregation with *Streptococcus oralis* through specific domains. J Dent Res 1997; 76: 852-857.
5. Amano A, Kuboniwa M, Kataoka K. Binding of hemoglobin by *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Microbiol Lett 1995; 134: 63-67.
6. Amano A, Sharma A, Lee J-Y, Sojar HT, Raj PA, Genco RJ. Structural domains of *Porphyromonas gingivalis* recombinant fibrillin that mediates binding to salivary proline-rich protein and statherin. Infect Immun 1996; 64: 1631-1637.
7. Amano A, Sojar HT, Lee J-Y, Sharma A, Levine MJ, Genco RJ. Salivary receptors to recombinant fimbrillin of *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun 1994; 62: 3372-3380.
8. Andrian E, Greiner D, Rouabhia M. *In vitro* models of tissue penetration and destruction by *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun 2004; 72: 4689-4698.
9. Aramaki M, Nagasawa T, Koseki T, Ishikawa I. Presence of activated B-1 cells in chronic inflamed gingival tissues. J Clin Immunol 1998; 18: 421-429.
10. Assuma R, Oates T, Cochran, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. The J Immunol 1998; 160: 403-409.

11. Awano S, Ansai T, Mochizuki H, Yu W, Tanzawa K, Turner AJ. Sequencing, expression and biochemical characterization of the *Porphyromonas gingivalis* pepO gene encoding a protein homologous to human oncoethelin-converting enzyme. FEBS Lett 1999; 460: 139-144.
12. Baker PJ, Evans RT, Roopenian DC. Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and induced alveolar bone loss in immunocompetent and severe immunodeficient mice. Arch Oral Biol 1994; 39(12): 1035-1040.
13. Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC. CD4+ T cells and proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. Infect Immun 1999; 67: 2804-2809.
14. Baker PJ, Dixon M, Roopenian DC. Genetic control of susceptibility to alveolar bone loss in mice. Infect Immun 2000; 68: 5864-5868.
15. Baker PJ, Howe L, Garneau J, Roopenian DC. T cell knockout mice have diminished alveolar bone loss after oral infection with *Porphyromonas gingivalis*. FEMS 2002; 34: 45-50.
16. Baron R, Vignery A, Horowitz M. Lymphocytes, macrophages, and the regulation of bone remodeling, pág. 175-243. In WA Peck (ed), Bone and mineral research annual 2: a yearly survey of developments in the field of bone and mineral metabolism. Elsevier Science Publishers, New York, NY.
17. Bezerra MM, De Lima V, Alencar VBN, Vieira IB, Brito GAC, Ribeiro RA et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. J Periodontol. 2000; 71 (6): 1009-1014.
18. Bourgeau G, Lapointe H, Peloquin P, Mayrand D. Cloning expression and sequencing of a protease gene (tpr) from *Porphyromonas gingivalis* strain W83 in *Escherichia coli*. Infect Immun 1992; 60: 3186-3192.
19. Boyce BF, Aufdemorte TB, Garret IR, Yates AJP, Mundy GR. Effects of interleukin-1 on bone turnover in normal mice. Endocrinology 1989; 125: 1142-50.

20. Boyce BF, Yates AJP, Mundy GR. Bolus injections of recombinant human interleukin-1 cause transient hypocalcemia in normal mice. *Endocrinology* 1989; 125: 2780-3.
21. Bradshaw Dj, Marsh PD, Watson GK, Allison C. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infect Immune* 1998; 66: 4729-4732.
22. Bragd L, Dahlén G, Wikström M, Slots J. The capability of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis; a retrospective study. *J Clin Periodontol* 1987; 14: 95-99.
23. Budu CE, Luengpailin J, Reyes G. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* are modified by polyphenol oxidase and asparaginase. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 313-317.
24. Burdon KL. *Bacterium melaninogenicum* from normal and pathologic tissues. *J Infect Dis* 1928; 42: 161-171.
25. Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol* 2000 2006; 43: 160-232.
26. Chen HA, Johnson BD, Sims TJ et al. Humoral immune response to *Porphyromonas gingivalis* before and following therapy in rapidly progressive periodontitis patients. *J Periodontol* 1991; 62:781-791.
27. Collota F, Re F & Muzio M. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target of IL-1 that is regulate by IL-4. *Science* 1993; 261: 472-75.
28. Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, et al. Receptor activator NF kappa B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Period Res* 2003; 38: 380-387.
29. Curtis MA, Slayne JM, Carman RJ, Johnson NW. Identification of the major surface protein antigens of *Porphyromonas gingivalis* using IgG antibody reactivity of periodontal case control serum. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6: 321-326.

30. Curtis MA, Kuramitsu HK, Lantz M, Macrina FL, Nakayama K, Potempa J, et al. Molecular genetics and nomenclature of proteases of *Porphyromonas gingivalis*. J Period Res 1999; 34: 464-472.
31. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. Periodontol 2000 1997; 14: 12-32.
32. De Wall Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor C, de Vries J. Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med 1991; 174: 1209-1220.
33. Dick DS & Shaw JH. The infectious and transmissible nature of the periodontal syndrome of the rice rat. Arch Oral Biol 1966; 11: 1095-1108.
34. Dinarello C. Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood 1996; 87: 2095-2147.
35. DiRienzo JM & Slots J. Genetic approach to the study epidemiology and pathogenesis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis. Arch Oral Biol 1990; 35: suplem: 79S-84S.
36. Duncan AJ, Carman RJ, Harper FH, Griffiths GS, Curtis MA. *Porphyromonas gingivalis*: presence of specie-specific antigen which is discriminatory in chronic inflammatory adult periodontal disease. Microbiol Ecol Health Dis 1992; 5: 15-20.
37. Dzink JL, Gibbons RJ, Childs WC III, Socransky SS. The predominant cultivable microbiota of crevicular epithelial cells. Oral Microbiol Immunol 1989; 4: 1-5.
38. Ebersole JL, Taubman MA, Smith DJ, Frey DE, Haffajee AD, Socransky SS. Human serum antibody responses to oral microorganisms. IV. Correlation with homologous infection. Oral Microbiol Immunol, 1987; 12: 53-59.
39. Ebersole JL, Brunsvold M, Steffensen B, Wood R, Holt SC. Effects of immunization with *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* on progression of ligature-induced periodontitis in the nonhuman primate *Macaca fascicularis*. Infect Immunol 1991; 59: 3351-1159.

40. Essner R, Rhoades K, McBride W, Morton D, Economou J. IL-4 down-regulates IL-1 e TNF gene expression in human monocytes. J Immunol 1989; 142: 3857-3861.
41. Evans RT, Klausen B, Genco RJ. Immunization with fimbrial protein and peptide protects against *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontal tissue destruction. Adv Exp Med Biol 1992; 327: 255-262.
42. Fisher RJ, Klinge B. Clinical and histological evaluation of ligature-induced periodontal breakdown in domestic ferrets. J Clin Periodontol 1994; 21(4): 230-239.
43. Fujihashi K, Kono Y, Beagley KW, Yamamoto M, McGhee JR, Mestecky J et al. Cytokines and periodontal disease: immunopathological role of interleukins for B cell responses in chronic inflamed gingival tissue. J Periodontol 1993; 64: 400-406.
44. Galvão MP de A, Chapper A, Rösing CK, Ferreira MBC, Souza MAL de. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. Pesq Odontol Bras 2003; 17(1): 56-62.
45. Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Ávila-Campos MJ, Cunha FQ et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL and their physiological inhibitors. Oral Microbiol Immunol 2006; 21: 12-20.
46. Garlet GP, Martins W Jr, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. J Clin Periodontol 2004; 31: 671-679.
47. Gemmel E, Kjeldsen M, Yamazaki K, Nakajima T, Aldred MJ, Seymour GJ. Cytokines profiles of *Porphyromonas gingivalis*-reactive T lymphocytes lines and clone derived from p. gingivalis-infected subjects. Oral Dis 1995; 1: 139-146.
48. Gemmel E, Yamazaki K, Seymour GJ. The role of T cell in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. Periodontol 2000 2006; 43: 14-40.

49. Gemmel E, Winning TA, Bird PS, Seymour GJ. Cytokine profiles of lesional and splenic T cells in *Porphyromonas gingivalis* infection in a murine model. J Periodontol 1998; 69: 1131-1138.
50. Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. J Periodontol 1996; 67 (Supl. 10), 1041-1049.
51. Genco RJ. Host response in periodontal disease: current concepts. J Periodontol 1992; 63: 338.
52. Gery I, Waksman BH. Potentiation of T-lymphocyte response to mitogens. J Exp Med 1972; 136: 143-155.
53. Gibbons RJ, Hay DI. Adsorbed salivary proline-rich proteins as bacterial receptors on apatic surfaces. Em Switalski LM, Hook M, Beachey E editors. Molecular Mechanism of oral adhesion. New York: Springer-verlag, 1988: 143-169.
54. Glickman I. The experimental basis for the bone factor concept in periodontal disease. J Periodontol 1951; 20:7.
55. Gmur R, Strub JR, Guggenheim B. Prevalence of *Bacteroides forsythus* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. J Periodontal Res 1989; 24:113-120.
56. Goldharber P, Rabadjija L, Beyer WR, Kornhauser A. Bone resorption in tissue culture and its relevance to periodontal disease. J Am Dent Assoc 1973; 87(5): 1027-1033.
57. Gowen M, Mundy GR. Action of recombinant interleukin-1, interleukin-2 e interferon- γ on bone resorption *in vitro*. J Immunol 1986; 136: 2478-82.
58. Gowen M, Wood DD, Ihrie EJ, McGuire MKB, Russel RGG. An interleukin-1-like factor stimulates bone resorption *in vitro*. Nature 1983; 306: 378-80.
59. Greiner D, Mayrand D. Selected characteristic of pathogenic and nonpathogenic strains of *Bacteroides gingivalis*. Infect Immun 1987. 25: 738-740.
60. Griffen AL, Becker MR, Lyons SR, Moeschberger ML, Leys EJ. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status. J Clin Microbiol 1998; 36: 3239-3242.

61. Graves DT & Jiang Y. Chemokines a family of chemotactic cytokines. Crit Rev Oral Biol Med 1995; 6: 109-118.
62. Gruber HE. Bone and the immune system. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1991; 197: 219-225.
63. Gupta OP & Shaw JH. Periodontal disease in the rice rat. Anatomic and histopathologic findings. Oral Surg 1956; 9: 592-603.
64. Haak-Frendscho M, Marsters S, Mordenti J, Brady S, Gillett N, Chen S, et al. Inhibition of TNF by TNF receptor immunoadhesion. Comparison to anti-TNF monoclonal antibody. J Immunol 1994; 152: 1347-1353.
65. Haffajee AD, Socransky SS, Dzink JL, Taubman LA, Ebersole JL. Clinical, microbiological and immunological features of subjects with refractory periodontal diseases. J Clin Periodontol 1988; 15: 255-262.
66. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal disease. Periodontol 2000 1994; 5: 78-111.
67. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Development regulation of microbial biofilms. Current Opinion in Biotechnology, 2002; 13, 228-233.
68. Hamada S, Fujiwara T, Morishima S, Takahashi I, Nakagawa I, Kimura S, et al. Molecular and immunological characterization of the fimbriae of *Porphyromonas gingivalis*. Microbiol Immunol 1994; 38:921-930.
69. Hausmann E. Potential pathways for bone resorption in human periodontal disease. J Periodontol 1974; 45(5): 338-343.
70. Heath JK, Saklatvala J, Meikle MC, Atkinson SJ, Reynolds JJ. Pig interleukin-1 (catabolin) is a potent stimulator of bone resorption *in vitro*. Calcif Tissue Int 1985; 37: 95-7.
71. Hemmens ES and Harrison RW. Studies on the anaerobic bacterial flora of suppurative periodontitis. J. Infect Dis 1942; 70: 131-146.
72. Hempel L, Korholz D, Bonig H, et al. Interleukin-10 directly inhibits the interleukin-6 production in T-cells. Scand J Immunol 1995; 41: 462-466.
73. Herminajeng E, Sosroseno W, Bird PS, Seymour GJ. The effects of interleukin-10 depletion *in vivo* on the immune response to *Porphyromonas gingivalis* in a murine model. J Periodontol 2001 Nov; 72: 1527-1534.

74. Holt SC, Ebersole J, Felton J, Brunsvold M, Kornman KS. Implantation of *Bacteroides gingivalis* in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. *Science* 1988; 239: 55-57.
75. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors in *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000 1999, 20: 168-238
76. Holt SC, Ebersole J. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*; the red complex, prototype by a pathogenic consort in periodontitis. *Periodontol* 2000 2007; 12: 72-122.
77. Hood L, Heath JR, Phelps ME, Lin B. Systems biology and new technologies enable predictive preventative medicine. *Science* 2004; 306: 640-643.
78. Howard M, O'Garra A, Ishida H, de Waal Malefyt R, de Vries J. Biological properties of interleukin-10 *J Clin Immunol* 1992; 12: 239-247.
79. Imamura T. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol* 2003; 74: 111-118.
80. Irakami H, Kawata Y, Kitano S, Hanazawa S. *Porphyromonas gingivalis* fimbria-stimulated bone resorption is inhibited through binding of the fimbriae to fibronectin. *Mol Microbiol* 1997. 24: 1179-1187.
81. Iribe H, Koga T, Kotani S, Kusumoto S, Shiba T. Stimulating effect of MDP and its adjuvant-active analogues on guinea pig fibroblasts for the production of thymocyte-activating factor. *J Exp Med* 1983; 157: 2190-2195.
82. Irving JT, Socransky SS, Heeley JD. Histological changes in experimental periodontal disease in gnotobiotic rats and conventional hamsters. *J Periodontal Res* 1974; 9: 73-80.
83. Irving JT, Newman MG, Socransky SS, Heeley JD. Histological changes in experimental periodontal disease in rats monoinfected with a Gram negative organism. *Arch Oral Biol* 1975; 20: 219-220.
84. Irving JT, Socransky SS, Tanner AC. Histological changes in experimental periodontal disease in rats monoinfected with a Gram negative organism. *J Period Res* 1978; 13: 326-332.

85. Ishikawa I, Nakashima K, Koseki T et al. Induction of immune response to periodontopathic bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000 1997; 14: 79-111.
86. Ishikawa I. Host response in periodontal diseases: a preview. *Periodontol* 2000, 2007; 43: 9-13.
87. Isogai E, Isogai H, Sawada H, Kaneko H, Ito N. Microbial ecology of plaque in rats with naturally occurring gingivitis. *Infect Immun* 1985; 48(2): 520-527.
88. Itoh K & Hitohata S. The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation and differentiation. *J Immunol* 1995; 154: 4341-4350.
89. Jagels MA, Ember JA, Travis J, Potempa J, Pike R, Hugli TE. Cleavage of human C5a receptor by proteinases derived from *Porphyromonas gingivalis*: cleavage of leukocyte C5a receptor. *Adv Exp Med Biol* 1996a; 389: 155-164.
90. Jagels MA, Travis J, Potempa J, Pike R, Hugli TE. Proteolytic inactivation of the leukocyte C5a receptor by proteinases derived by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 1996b; 64: 1984-1991.
91. Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS et al. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* 1992; 257: 88-91.
92. Johnson IH. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *J Periodont Res.* 1975; 10: 332-45.
93. Johnson V, Johnson BD, Sims TJ, Whitney CW, Moncla BJ, Engel LD. Effects of treatment on antibody titer to *Porphyromonas gingivalis* in gingival crevicular fluid of patients with rapidly progressive periodontitis. *J Periodontol* 1993; 64: 559-565.
94. Kadowaki T, Yoneda M, Okamoto K, Maeda K, Yamamoto K. Purification and characterization of a novel arginine-specific cysteine proteinase (argingipain) involved in the pathogenesis of periodontal disease from the culture supernatant of *Porphyromonas gingivalis*. *L Biol Chem* 1994; 269: 21371-21378.

95. Kahnberg KE, Lindhe J, Hellden L. Initial gingivitis induced by topical application of plaque extract. A histometric study in dogs with normal gingiva. J Periodontol Res 1976; 11(4): 218-225.
96. Kamaguchi A, Nakayama K, Ichiyama S, Nakamura R, Watanabe T, Ohta M, Baba H, Ohya T. Effect of *Porphyromonas gingivalis* vesicles on coaggregation of *Staphylococcus aureus* to oral microorganisms. Curr Microbiol 2003; 47: 485-491.
97. Katagiri T & Takahashi N. Regulatory mechanism of osteoblast and osteoclast differentiation. Oral Dis 2002; 8: 147-159.
98. Kataoka M, Li H, Arakawa S, Kuramitsu H. Characterization of methyl-accepting chemotaxis protein genem dmca oral spirochete *Treponema denticola*. Infect Immun 1997; 65: 4011-4016.
99. Kesavalu L, Holt SC, Ebersole JL. Trypsin-like protease activity of *Porphyromonas gingivalis* is potential virulence factor in murine lesion model. Microb Pathog 1995; 20: 1-10.
100. Keyes PH & Jordan HV. Periodontal lesions in Syrian hamster. III. Findings related to an infectious and transmissible component. Arch Oral Biol 1964; 9: 377-400.
101. Keyes PH, Rowberry SA, Englander HR, Fitzgerald RJ. Boiassays of medicaments for the control of dentobacterial plaque, dental caries and periodontal lesions in Syrian hamsters. J Oral Therapeutics 1966; 3: 157-173.
102. Kinane DF, Mooney J, MacFarlane TW, McDonald M. Local and systemic antibody response to putative periodontopathogens in patients with chronic periodontitis: correlation with clinical indices. Oral Microbiol Immunol 1993; 8: 65-68.
103. Kirkwood KL, Cirelli J, Giannobile WV. Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. Periodontol 2000 2006; 43: 294-314.

104. Kiyama M, Hayakawa M, Shiroza T, Nakamura S, Takeuchi A, Masamoto Y et al. Sequence analysis of the *Porphyromonas gingivalis* dipeptidyl peptidase IV gene. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1396: 39-46.
105. Kjelleberg S, Molin S. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms. *Current Opinions in Microbiology* 2002; 5, 254-258.
106. Klausen B. Microbiological and imunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol*. 1991; 62: 59-73.
107. Kobayashi-Sakamoto M, Isogai E, Hirose K. *Porphyromonas gingivalis* modulates the production of interleukin-8 and monocyte chemotatic protein-1 in human vascular endothelial cells. *Curr Microbiol* 2003; 46: 109-124.
108. Koide M, Suda S, Saitoh S, Ofuji Y, Suzuki T, Yoshie H, et al. In vivo administration of IL-1 β accelerates silk-ligature induced alveolar bone resorption in rats. *J Oral Pathol Med* 1995; 24: 420-34.
109. Kojima T, Yasui S, Ishikawa I. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* in adult periodontitis patients. *J Periodontol* 1993; 64: 1231-1237.
110. Kontani M, Ono H, Shibata H. Cysteine protease of *Porphyromonas gingivalis* 381 enhances binding of fimbriae to cultured fibroblast and matrix proteins. *Infect Immun* 1996; 64: 756-762.
111. Kopf M, Baumann H, Freer G, Feundenberg M, Lamers M, Kishimoto T, et al. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6 deficient mice. *Nature* 1994; 368: 339-342.
112. Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol* 2008; 79: 1560-1568.
113. Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodont Res* 2004; 39; 101-106.
114. Kupper TS, Ballard DW, Chua AO et al. Human keratinocytes contain mRNA indistinguishable from monocytes in interleukin-1 α and β mRNA. *J Exp Med* 1986; 164: 2095-100.

115. Kurt-Jones EA, Beller DI, Mizel SB, Unanue ER. Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 1204-1208.
116. Lamont RJD, Chan CM, Belton KT, Izutsu T, Vasei D & Weinberg A. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infection and Immunity* 1995a, 63: 3878-3885.
117. Lamont RJD, Oda D, Persson RE & Persson GR. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells in culture. *Oral Microbiol Immunol* 1995b, 7: 364-367.
118. Laosrisin N, Nakashima K, Ishikawa I. Detection of *Bacteroides gingivalis* antigenic proteins by immunoblotting analysis. *J Periodontol* 1990; 61: 261-268.
119. Leon LR, Kozak W, Kluger MJ. Role of IL-10 in inflammation. Studies using knockout mice. *Ann NY Acad Sci* 1998; 856: 69-75.
120. Lindhe J, Hamp SE, Löe H, Schiott CR. Influence of topical application of chlorhexidine on chronic gingivitis and gingival wound healing in the dog. *Scan J Dent Res* 1970; 78: 471-478.
121. Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1997.
122. Listgarten MA. Structure of microbial flora associated with periodontal health and disease in man. *J Periodontol* 1976; 5: 52-65.
123. Listgarten MA, Johnson D, Nowotny A, Crawford A, Socransky S. Pathogenesis of periodontal disease in rats monoinfected with *E. corrodens*. *J Dent Res* 1977; 56: 120.
124. Listgarten MA, Lindhe J, Parodi R. The effect of systemic antimicrobial therapy on plaque and gingivitis in dogs. *J Periodontal Res* 1979; 14: 65-75.
125. Listgarten MA. Electron microscopic observations on the bacterial flora of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol* 1965; 36: 328-339.
126. Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Huang L, Pavlos NJ, Rogers M, et al. Expressions of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med* 2003; 11: 17-21.

127. L  e H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. J Periodontol 1965; 36: 177.
128. Loesche WJ, Syed SA. Bacteriology of human experimental gingivitis: effect of plaque and gingivitis score. Infect Immun 1978; 21: 830-839.
129. Loesche WJ. Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. J Dent Res 1979; 58(12): 2404-2412.
130. Lopatin DE, Blackburn E. Avidity and titer of immunoglobulin G subclasses to *Porphyromonas gingivalis* in adult periodontitis patients. Oral Microbiol Immunol 1992; 7: 332-337.
131. Lopatin DE, LaBelle D, Lee SW. Measurement of relative avidity of antibodies reactive with *Porphyromonas gingivalis* in the sera of subjects having adult periodontitis. J Periodontal Res 1991; 26: 167-175.
132. Macdonald JB, Sutton RM, Knoll ML, Madlener EM, Grainger RM. The pathogenic components of an experimental mixed infection. J Infect Dis 1956; 98: 15-20.
133. Macdonald JB, Socransky SS, Sawyer SJ. A survey of bacterial flora of the periodontium in the rice rat. Arch Oral Biol 1959; 1: 1-7.
134. Macdonald JB, Socransky SS, Gibbons RJ. Aspect of the pathogenesis of mixed anaerobic infections of mucous membranes. J Dent Res 1963; 42: 529-544.
135. Machion L, Andia DC, Saito D, Klein MI, Gonçalves RB, Casati MZ, et al. Microbiological changes with use of locally delivered doxycycline in the periodontal treatment in smokers. J Periodontol 2004; 75: 1600-4.
136. Mahanonda R, Seymour GJ, Powell LW, Good MF, Halliday JW. Effect of initial treatment of chronic inflammatory periodontal disease on the frequency of peripheral blood T-lymphocytes specific to periodontopathic bacteria. Oral Microbiol Immunol 1991; 6: 221-227.
137. Marquez-San Miguel S, Rupf S, Frenzel J, Eschrich K. The effects of extracted from periodontopathic bacterial on human periodontal fibroblast stimulated with mineralization supplements. J Oral Sci 2003; 45: 127-137.

138. Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Alisson AC. Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 1990; 25(3): 156-163.
139. Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K. Interleukin-1 mRNA-expressing macrophages in human chronically inflamed gingival tissues. *Am J Pathol* 1991; 138: 1299-305.
140. Metzger Z, Featherstone LG, Ambrose WW, Ttroke M, Arnold RR. Kinetics of coaggregation of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* using an automated microtiter plate assay. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 163-169.
141. McFarlane CG, Reynolds JJ, Meikle MC. The release of interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α and interferon- γ by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with periodontitis. *J Periodont Res* 1990; 25: 207-214.
142. Miossec P, Cavender D, Ziff M. Production of interleukin-1 by human endothelial cells. *J Immunol* 1986; 136: 2486-91.
143. Mitchell DF & Johnson M. The nature of gingival plaque in the hamster: production, prevention and removal. *J Dent Res* 1956; 35:651-655.
144. Mogi M, Otogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res* 2004; 83: 166-169.
145. Mohler KM, Torrance DS, Smith CA, Goodwin RG, Stremmler KE, Fung V, et al. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol* 1993; 151: 1548-1561.
146. Mooney J, Adonogianaki E, Kinane DF. Relative avidity of serum antibodies to putative periodontopathogens in periodontal disease. *J Periodontal Res* 1993; 28: 444-450.
147. Moreland L, Baumgartner S, Schiff M, Tindall E, Fleischmann R, Weaver A, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor

- necrosis factor receptor (p-75)-Fc fusion protein. *New Eng J Med* 1997; 337: 141-147.
148. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cells subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17: 138-146.
 149. Mullarkey MF, Leiferman KM, Peters MS, Caro I, Roux ER, Hanna R, et al. Human cutaneous allergic late-phase response is inhibited by soluble IL-1 receptor. *J Immunol* 1994; 152: 2033-2041.
 150. Myiata Y, Takeda H, Kitano S, Hanazawa S. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated bone resorption via CD 14 is inhibited by broad-spectrum antibiotics. *Infect Immunol* 1997; 65: 3513-3519.
 151. Nagasawa T, Kobayashi H, Kiji M, Arakami M, Mahanonda R, Kojima T et al. LPS-stimulated human gingival fibroblast inhibit the differentiation of monocytes into osteoclasts through the production of osteoprotegerin. *Clin Exp Immunol* 2002; 130: 338-344.
 152. Nagasawa T, Kiji M, Yashiro R, Hormdee D, Lu H, Kunze M, Suda T, Koshy G, Kobayashi H, Oda S, Nitta H, Ishikawa I. Roles of receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. *Periodontol 2000* 2006; 43: 65-84.
 153. Nagata H, Amano A, Ojima M, Tanaka M, Kataoca K, Shizukuishi S. Effect of binding of fibrinogen to each bacterium on coaggregation between *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus oralis*. *Oral Microbiol Immunol* 1994; 9: 359-363.
 154. Nassar H, Kantarci A, Van Dyke TE. Diabetic periodontitis: a model for activated innate immunity and impaired resolutions of inflammation. *Periodontol 2000* 2006; 43: 233-244.
 155. Nelson D, Potempa J, Kordula T, Travis J. Purification and characterization of novel cysteine proteinase (periodontain) from *Porphyromonas gingivalis*. Evidence for a role in the inactivation of human α_1 -proteinase inhibitor. *J Biol Chem* 1999; 274: 12245-12251.

156. Nelson KE, Fleischmann RD, DeBoy RT, Paulsen IT, Fouts DE, Eisen JA et al. Complete genome sequence of the oral pathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis* strain W83. J Bacteriol 2003; 185: 5591-5601.
157. Nishihara T, Ishihara Y, Noguchi T, Koga T. Membrane IL-1 induces bone resorption in organ culture. J Immunol 1989; 143: 1881-6.
158. Nishimura F, Iwamoto Y, Soga Y. The periodontal host response with diabetes. Periodontol 200 2006: 43: 245-253.
159. Noguchi K, Ishikawa I. The roles of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E₂ in periodontal disease. Periodontol 2000 2006: 43: 85-101.
160. Nyman S, Schroeder HE, Lindhe J. Suppression of inflammation and bone resorption by indomethacin during experimental periodontitis in dogs. J Periodontol 1979; 50(9):450-461.
161. Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE₂ secretion as a determinant of periodontal disease expression. J Periodontol 1993; 64(5): 432-444.
162. Ogawa T, McGhee ML, Moldoveanu Z et al. *Bacteroides*-specific IgG and IgA subclass antibody-secreting cells isolated from chronically inflamed gingival tissues. Clin Exp Immunol 1989; 76: 103-110.
163. Ogawa T & Uchida H. A peptide, ALTTE, within the fimbrial subunit from *Porphyromonas gingivalis*, induces production of interleukin-6, gene expression and protein phosphorylation in human peripheral blood mononuclear cells. FEMS Immunol Med Microbiol 1995; 11: 197-206
164. Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, Yotsumoto H, Hara T, Kajihara S, Hisatomi A, Sakai T, Yamamoto K. Involvement of the ETs-1 gene in overexpression of matrix metalloproteinase-1 in human hepatocellular carcinoma. Cancer Res 2000; 60:6519-6525.
165. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. Periodontol 2000 1997; 14: 9-11.
166. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments,

- clinical implications and future directions. *Periodontol 2000* 1997; 4: 216-248.
167. Page RC, Schroder HE. Periodontitis in man and other animals. A comparative review. Basel: Karger, 1982: 71-106.
 168. Penberthy TW, Jiang Y, Graves DT. Leukocyte adhesion molecules. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997; 8: 380-88.
 169. Persson RG. Immune responses and vaccination against periodontal infections. *J Clin Periodontol* 2005; 32 (Supl. 6): 39-53.
 170. Poli V, Balena R, Fattori E, Markatos A, Yamamoto M, Tanaka H, et al. Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *EMBO J* 1994; 13: 1189-1196.
 171. Poulin R, Combes C. The concept of virulence: interpretations and implications. *Parasitol Today* 1999; 15: 474-475.
 172. Prabhu A, Michalowicz BS, Mathur A. Detection of local and systemic cytokines in adult periodontitis. *J Periodontol* 1996; 67: 515-522.
 173. Ramfjord SP & Ash Jr MM. *Periodontologia e periodontia: teoria e prática moderna*, São Paulo: Editora Santos, 1991, cap 6, p. 31-46, 47-59, 75-104.
 174. Renvert S, Dahlén G, Wikström M. Treatment of periodontal disease based on microbiological prognosis. Relation of microbiological and clinical parameters during 5 years. *J Periodontol* 1996; 67: 562-571.
 175. Richards D, Rutherford RB. The effect of interleukin-1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal-ligament and gingival fibroblasts. *Arch Oral Biol* 1988; 33: 237-43.
 176. Ridderstad A, Abedi-Valugerdi M, Moller E. Cytokines in rheumatoid arthritis. *Annals of Medicine* 1991; 23: 219-223.
 177. Rodan GA & Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 2000; 289: 1508-1514.
 178. Romas E, Sims NA, Hards DK, Lindsay M, Quinn JW, Ryan PF, et al. Osteoprotegerin reduces osteoclast numbers and prevents bone erosion in collagen-induced arthritis. *Am J Pathol* 2002; 161: 1419-1427.

179. Rosebury T, Macdonald JB, Clark AR. A bacteriologic survey of gingival scrapings from periodontal infections by direct examination, guinea pig inoculation and anaerobic cultivation. J Dent Res 1950; 29: 718-731.
180. Rovin S, Costich ER, Gordon AH. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germ-free and conventional rats. J Period Res 1966; 1: 193-204.
181. Saarela, M. et al. Persistence of oral colonization by the same *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain(s). J Periodontol, 1999 May; 70 (5): 504-509.
182. Sabatini M, Boyce B, Aufdemorte T, Bonewald L, Mundy GR. Infusions of recombinant human interleukins-1 α and -1 β causes hypercalcemia in normal mice. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 5235-9.
183. Saito D, Leonardo R de T, Rodrigues JL, Tsai SM, Höfling JF, Gonçalves RB. Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries. J Med Microbiol 2006, 55: 101-107.
184. Saiki K, Gomi T, Konishi K. Deletion and purification studies to elucidate the structure *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin. J Biochem 2004; 136: 335-342.
185. Sallay K, Sanavi F, Ring I, Pham P, Behling UH, Nowortny A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. J Periodontol Res. 1982, 17: 363-274.
186. Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan B. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. Periodontology 2000 1997; 14: 158-172.
187. Seitz M, Loestcher P, Dewald B, Towbin H, Gallati H, Baggiolini M. Interleukin-10 differentially regulates cytokine inhibitor and chemokine release from blood mononuclear cells and fibroblasts. Eur J Immunol 1995; 25: 1129-1132.
188. Shaw JH. Further studies of sensitivity of the periodontal syndrome in the rice rat to dietary antibiotics. J Dent Res 1965; 44: 431-438.

189. Simonson LG, Robinson PJ, Pranger RJ, Cohen ME, Morton HE. *Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivalis* as a prognostic markers following periodontal treatment. J Periodontol 1992; 63: 270-273.
190. Slots J. Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. J Clin Periodontol 1986; 13: 912-917.
191. Slots J. The predominant cultivable organism in juvenile periodontitis. Scan J Dent Res 1976; 84: 1-10.
192. Smalley JW, Birss AJ, Kay HM, McKee AS, Marsh PD. The distribution of trypsin-like enzyme activity in cultures of virulent and an avirulent strain of *Bacteroides gingivalis* W50. Oral Microbiol Immunol 1989; 4: 178-181.
193. Socransky SS, Macdonald JB, Sawyer SJ. Quantitative studies of the bacterial flora of the periodontium in rice rats. Arch Oral Biol 1960; 2: 104-110.
194. Socransky SS, Gibbons RJ. Required role of *Bacteroides melaninogenicus* in mixed anaerobic infections. J Infect Dis 1965; 115: 247-253.
195. Socransky SS, Haffajee AD. Microbial mechanisms in pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. J Periodontol Res 1991; 26, 195-212.
196. Socransky SS, Haffajee AD. Microbiology of periodontal disease. In: Lindhe, J., Karring, T. & Lang, NP. (eds) Clinical periodontology and Implant Dentistry, 4^o edição. Oxford: Blackwell Munksgaard.
197. Socransky SS, Haffajee AD. Microbiologia da doença periodontal. In: Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral 3^a edição. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 1999; 93-126.
198. Socransky SS. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. J Dent Res 1970; 49: 203-222.
199. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr. RL. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol 1998; 25: 134-144.
200. Socransky SS & Haffajee AD. Microbiological risk factors for destructive periodontal diseases. Em Bader JD, ed Risk assessment in dentistry. Chapel Hill: University of North Carolina Dental Ecology, pág 79-90.

201. Socransky SS, Haffajee AD, Smith GLF, Dzink JL. Difficulties encountered in the search for the etiologic agents of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1987; 14: 588-593.
202. Sorsa T, Suomalainen K, Uitto VJ. The role of gingival crevicular fluid and salivary interstitial collagenases in human periodontal diseases. *Arch Oral Biol* 1990; 35: 193S-196S.
203. Stashenko P, Dewhirst FE, Peros WJ, Kent RL. Synergistic interaction between IL-1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol* 1987; 138: 1464-1468.
204. Stamm JW. Periodontal diseases and human health: new directions in periodontal medicine. *Ann Periodontol* 1998; 3: 1-2.
205. Stein SH & Hendrix CL. Interleukin-10 promotes anti-collagen antibody production in gingival mononuclear cells. *J Dent Res* 1996; 75(volume especial): 158 (resumo 1122).
206. Stewart RJ, Marsden PA. Biologic control of tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling cascade. *Am J Kidney Dis* 1995; 25: 954-966.
207. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrin Rev* 1999; 20: 345-357.
208. Takada H, Mihara J, Morisaki I, Hamada S. Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with *Bacteroides* lipopolysaccharides. *Infect Immun* 1991; 59: 295-301.
209. Takata T, Nikai H, Ijuhin N, Ito H. Penetration and uptake of colloidal gold-labeled concanavalin A in the junctional epithelium of the rat. *J. Periodontol.* 1988 Dec; 59 (12): 823-9.
210. Tanner ACR, Haffer C, Brathall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol* 1979; 6: 278-307.
211. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289: 1504-1508.

212. Teng YT, Nguyen H, Gao X, Kong YY, Gorczynski RM, Singh B et al. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest* 2000; 106: 59-67.
213. Theilade E, Wright WHY, Jensen SB, Løe H. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodontal Res* 1966; 1: 11-13.
214. Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1986; 13(10): 905-911.
215. Ukai T, Hara Y, Kato I. Effects of the cell adaptive transfer into nude mice on alveolar bone resorption induced by endotoxin. *J Periodontal Res* 1996; 31: 414-422.
216. Valverde P, Kawai T, Taubman MA. Selective blockade of voltage-gated potassium channels reduces inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 155-164.
217. van Steenberg TJM, van Winkelhoff AJ, de Graaff J. Black pigmented oral anaerobic rods: Classification and role in periodontal disease. In: Hamada S, Holt SC, McGhee JR, eds. *Periodontal disease: Pathogen E Host Immune Response*. Tokyo: Quintessence Publishing Co., Ltd; 1991.
218. Van Winkelhoff AJ, van der Velden U, Graaff J. Microbial succession in recolonizing deep periodontal pockets after a single course of supra – subgingival debridement. *J Clin Periodontol* 1988; 57: 116-122.
219. Van Winkelhoff AJ, Loss BG, van der Reijden WA, van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 11: 1023-1028.
220. Weeks-Dybvig M, Sanavi F, Zander H, Rifkin BR. The effect of indomethacin on alveolar bone loss in experimental periodontitis. *J Periodontol Res*. 1982; 17:90-100.
221. Weckmann AL & Alcocer-Varela J. Cytokine inhibitors in autoimmune disease. *Semin Arthritis Rheum* 1996; 2: 539-557.

222. Whitney C, Ant J, Moncla B, Johnson B, Page RC, Engel D. Serum immunoglobulin G antibody to *Porphyromonas gingivalis* in rapidly progressive periodontitis: titer, avidity and subclass distribution. *Infect Immunol* 1992; 60: 2194-2200.
223. Wingrove JA, DiScipio RG, Chen Z, Potempa J, Travis J, Hugli TE. Activation of complement component C3 and C5 by a cysteine proteinase (gingipain-1) from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem* 1992; 267: 18902-18907.
224. Yamaguchi T, Kasamo K, Chuman M, Machigachira M, Inoue M, Sueda T. Preparation and characterization of an *Actinomyces naeslundii* aggregation factor that mediates coaggregation with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* 1998; 33: 460-468.
225. Yamazaki K, Nakajima T, Kubota Y, Gemmel E, Seymour GJ, Hara K. Cytokine messenger RNA expression in chronic inflammatory periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 1997; 12: 281-287.

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

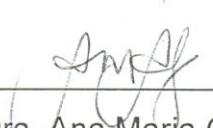
CERTIFICADO

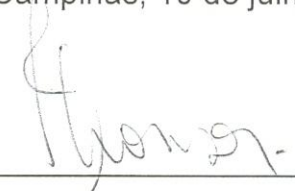
Certificamos que o Protocolo nº 1573-1, sobre "Inoculação de *Porphyromonas gingivalis* pode modular doença periodontal em ratos", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior / Tatiana Meulman Leite da Silva, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 10 de julho de 2008.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1570-1, entitled "*Porphyromonas gingivalis* inoculation may modulate periodontal disease in rats", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on July 10, 2008.

Campinas, 10 de julho de 2008.



Profa. Dra. Ana Maria Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva