

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 08/04/2018.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



FERNANDA REGINA GODOY ROCHA

**INFLAMASSOMOS NLRC4 E NLRP3 NA DOENÇA PERIODONTAL
EXPERIMENTAL INDUZIDA POR AGGREGATIBACTER
ACTINOMYCETEMCOMITANS**

Araraquara

2016



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



FERNANDA REGINA GODOY ROCHA

**INFLAMASSOMOS NLRC4 E NLRP3 NA DOENÇA PERIODONTAL
EXPERIMENTAL INDUZIDA POR *AGGREGATIBACTER*
*ACTINOMYCETEMCOMITANS***

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração em Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

Araraquara

2016

Rocha, Fernanda Regina Godoy

Inflamassomos NLRC4 e NLRP3 na doença periodontal experimental induzida por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* / Fernanda Regina Godoy Rocha .-- Araraquara: [s.n.], 2016.

115f. ; 30 cm.

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

Orientador: Prof. Dr Carlos Rossa Junior

1. Doenças periodontais 2. Inflamação 3. Inflamassomos
4. Imunidade inata 5. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

FERNANDA REGINA GODOY ROCHA

**INFLAMASSOMOS NLRC4 E NLRP3 NA DOENÇA PERIODONTAL
EXPERIMENTAL INDUZIDA POR *AGGREGATIBACTER*
*ACTINOMYCETEMCOMITANS***

Tese para obtenção do grau de Doutor

Comissão julgadora

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

2º Examinador: Dra. Shannon Margaret Wallet

3º Examinador: Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz

4º Examinador: Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros

5º Examinador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

Araraquara, 08 de abril de 2016

DADOS CURRICULARES

FERNANDA REGINA GODOY ROCHA

Nascimento 04 de outubro de 1985 – Taquaritinga, SP

Filiação José Rocha
Ana Maria Godoy

2004 – 2007 Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Araraquara
Universidade Estadual Paulista – UNESP

2010 – 2012 Pós-Graduação em Periodontia
Nível de Mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara
Universidade Estadual Paulista – UNESP

2012 – 2016 Pós-Graduação em Periodontia
Nível de Doutorado
Faculdade de Odontologia de Araraquara*
Universidade Estadual Paulista – UNESP

* Doutorado Sanduíche: 12 meses, de novembro de 2014 a novembro de 2015, na Universidade da Florida – UF - School of Dentistry, Waller Lab, Department of Oral Biology.

DEDICATÓRIA

Antes de tudo, dedico **ao meu Deus** este trabalho. Sou grata pela oportunidade de estar aqui, aprender e conhecer mais profundamente, ainda que tão pequena parte, do que tão perfeitamente criou!

Com todo meu amor, agradeço ao Deus que me dá forças...
Agradeço pela vida, saúde, sustento, proteção e direção que tem me dado
a cada dia,

E por estar me dando mais do que jamais pedi ou imaginei.

Muito obrigada, meu Senhor!

À minha mãe, Ana,

A mulher mais forte que eu já conheci.

Se estou realizando um sonho agora, mais uma vez, certamente estou porque você acreditou nisto mais do que eu mesma. Obrigada por me incentivar em todo o tempo, tendo feito sempre o que podia para que isso acontecesse, ainda que em meio a tantas dificuldades.

Obrigada por nunca me deixar desistir de nada do que sonhei.

Seus valores dignos, honestidade, humildade e dedicação são os exemplos que quero sempre ter comigo. Espero algum dia conseguir retribuir ao menos parte do que sempre fez por mim com tanto amor. Você é responsável por esta conquista!

Eu te amo tanto... Muito obrigada por tudo!!

À minha avó, Donília,

Sempre perto, cuidando de tudo com muita atenção e dedicação.

Ter sua presença em minha vida, seu apoio incondicional em cada gesto de amor, sua alegria comigo a cada passo dado, tudo isso é muito importante!

Obrigada por tudo que faz por mim e por entender minha ausência nestes anos. Com muito amor, obrigada!

Ao meu pai, José Rocha (*in memoriam*),

Principalmente em momentos como este, de realização e dever cumprido, percebo como foi tão importante ter aprendido com sua força de vontade e persistência. Momentos como este também são os que sinto mais a sua falta. Lembro-me sempre do quanto me amava e se preocupava comigo.

Sei que estaria realizado em me ver e saber como estou hoje!

Também sei que de alguma forma está...

Com amor e imutável saudade, obrigada!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Rossa Junior,

Serei sempre imensamente grata pelas oportunidades que me deu, pelo privilégio de todo o aprendizado, o convívio, e o crescimento que este período me trouxe.

Obrigada por sempre me receber tão bem, me ensinando e ajudando com disponibilidade e paciência, em todos os momentos em que precisei.

Muito obrigada por todo o seu conhecimento transmitido, pelo 'pensamento científico' despertado, e também pelo convívio pessoal que tanto me ensinou, pois pude aprender todos os dias com seu profissionalismo, objetividade, dedicação, simplicidade e competência tão admiráveis. A você, todo o meu respeito, reconhecimento, admiração, e a mais sincera gratidão!!!

Ao Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio

Obrigada por ser meu professor, amigo, e 'pai' nesta Faculdade.
Sou extremamente grata por poder conviver e aprender tanto com você
durante todos estes anos.

Levarei sempre comigo tudo o que me ensinou, tanto profissional quanto
pessoalmente. Além de ter aberto caminhos para que estas oportunidades
viesses para mim, pois sei que não estaria concluindo esta etapa agora se
não fosse por você, agradeço também por seu exemplo de integridade,
caráter, ética e humanidade. Saiba que sempre terá todo o meu carinho,
respeito e grande admiração!!

À Dra Shannon Margaret Wallet,

Muito obrigada por me ter me recebido tão prontamente e por ter feito muito mais do que o esperado por este trabalho e por mim também. Sinto-me abençoada pela oportunidade de conviver e aprender com você, científica, profissional e pessoalmente.

Obrigada por todos os ensinamentos transmitidos, ajuda e colaboração em todos os momentos, por seu exemplo, incentivo e paciência, fazendo com que eu me sentisse parte de seu laboratório. Eu não poderia ter tido um lugar melhor para fazer o doutorado sanduíche, e serei sempre profundamente grata por ter me proporcionado isso!!

Aos membros da comissão julgadora,

Dra Shannon Margaret Wallet

Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz

Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros

Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

Muito obrigada a todos pela prontidão e disponibilidade em
participar, pelo tempo cedido e contribuição dadas.
Como não o farei presencialmente, antecipadamente,
agradeço a cada um.

À **CAPES** e ao **CNPq** pelo apoio financeiro imprescindível e à **FAPESP (processos #2014/04926-8 e #2014/17544-6)**,
pelo financiamento com bolsas concedidas no Brasil e no exterior,
possibilitando a realização deste trabalho,
todo meu reconhecimento e sincera gratidão.

Aos amigos **João, Fabiana, Sabrina Frasnelli, Marcell, Ligia, Sabrina Garcia, Morgana**, com os quais pude compartilhar de intenso e agradável convívio no laboratório. Muito obrigada por tudo o que me ensinaram e por sempre me ajudarem em tudo o que precisei. Vocês foram essenciais, tanto para a realização deste trabalho quanto para melhorar meu dia a dia!

A todos os membros do **Wallet Lab**, do Departamento de Biologia Oral da Universidade da Florida – UF, onde estive durante o doutorado sanduíche, e que se tornaram amigos. Minha profunda gratidão a cada um de vocês, especialmente **Andrea, Heather, Christina, Gavin, Dan, Byron, Ines, Decheng**, muito obrigada por terem me recebido tão bem, por toda ajuda, pelos ensinamentos, e por fazerem meus dias tão melhores!!

Aos **meus amigos especiais** que me acompanharam durante esta fase: Angélica, Jaquelline, Helder, Fabiana, Felipe, Sara, Janaína, foi tão importante poder contar com o apoio de vocês!! Muito obrigada por estarem presentes nos melhores e nos piores momentos, estando longe ou perto! É uma benção te-los em minha vida... Pelo incentivo, pela força, pelas risadas, desabafos, muito obrigada por tornarem tudo mais fácil!!

A **todos os meus familiares**, em especial tios Nailde e José, Cacilda, Sérgio, e meus primos Marcos, Rafaela, Rodrigo, Ellena, muito obrigada por estarem sempre presentes, ajudando e incentivando em tudo que puderam. O amor, o carinho, os valores transmitidos e a torcida de vocês sempre foram fundamentais.

À **família bendita** que Deus me deu. Especialmente Célia, Gilberto, Paulo, Miriam, Cidinha, Ana Paula, Eliezer, Ester, Camila, Patrícia, Carol, gostaria de citar tantos nomes aqui... mas prefiro chamá-los de minha família, pois é isso, vocês fazem parte da minha vida. Muito obrigada pelas orações, amor e fé de vocês, por me ajudarem e estarem sempre comigo!

Aos amigos do **curso de Doutorado em Periodontia**:
Felipe, Livia, Giovana, Marcell, Sabrina, Rafael, sempre presentes; obrigada pela amizade, companheirismo e ajuda em todos os momentos divididos nestes anos. Vocês são muito especiais!

Aos meus primeiros orientadores, **Profa. Dra. Estela Sasso Cerri** e **Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri**, da Disciplina de Histologia desta faculdade pelos quais tenho muito carinho, admiração e gratidão. Obrigada por tudo que aprendi com vocês, e também pelo interesse despertado, ainda naquela fase, pela área acadêmica, e que foi essencial para que eu estivesse aqui agora!

À admirável **Profa. Dra. Andréia Affonso Barreto Montandon**, por sua amizade, exemplo e incentivo. Suas palavras, carinho e compreensão foram fundamentais para esta realização em minha vida. Obrigada por sempre estar perto, me acompanhando desde que cheguei a esta Faculdade. Minha mais sincera gratidão, carinho e admiração!

Meus sinceros agradecimentos...

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP**, na pessoa de sua Diretora, **Profa. Dra. Andréia Affonso Barreto Montandon e Vice-Diretora, Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato**, por todo o crescimento profissional aqui proporcionado.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Área de Periodontia**, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, em nome do coordenador, **Prof. Carlos Rossa Junior**, e a todos os demais docentes do Curso de Pós-Graduação, pela atenção dada e conhecimentos transmitidos.

A todos Docentes da Disciplina de Periodontia: **Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior, Profa Dra Rosemary Adriana Chierici Marcantonio, Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Profa Dra Silvana Regina Perez Orrico, Prof. Dr. Carlos Rossa Junior, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Profa Dra Daniela Leal Zandim Barcellos**, pela dedicação, amizade, formação e exemplo profissional que recebo de vocês desde a graduação.

A todos os colegas do Curso de Pós-Graduação com quem convivi, e também aos da graduação ou de outros cursos de Pós-Graduação; sou grata a todos, desde as experiências transmitidas até os momentos de descontração, o convívio com vocês tornou os dias melhores!

A todos os funcionários e amigos da Disciplina de Periodontia: **D. Maria, Regina Lucia, Maria José (Zezé), Isabela, Cláudia, Leandro e Suleima**, pelo agradável convívio, carinho, atenção e dedicação sempre presentes.

Aos funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia: Priscila, **Toninho** e Thelma, pela disponibilidade e eficiência constantes.

Aos funcionários da Seção de Pos-Graduação, **Mara, José Alexandre e Cristiano**, por toda a atenção, gentileza, e extrema paciência para ajudar.

A todos os funcionários da Biblioteca, pela dedicação e colaboração em todos esses anos.

E a todos os que de alguma forma fizeram parte deste período, contribuindo e/ou torcendo por mim,

MUITO OBRIGADA!!!

“Tudo quanto fizerdes, fazei-o de todo o coração...”

(Colossenses 3:23)

”Em tudo dai graças...”

(I Tessalonissences 5:18)

Rocha FRG. Inflamassomos NLRC4 e NLRP3 na doença periodontal induzida por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

RESUMO

Inflamassomos são complexos multi protéicos capazes de amplificar o sinal inflamatório em condições de interações microbiota-hospedeiro e destruição tecidual, como a doença periodontal crônica. Devido à escassez de informações sobre o papel dos inflamassomos NLRC4 e NLRP3 na doença periodontal, utilizamos neste estudo um modelo de doença periodontal induzida por bactérias em camundongos WT, Ipaf-knockout (Ipaf-KO), Caspase 1-knockout (Casp1-KO) e NLRP3-knockout (NLRP3-KO) para descrever o efeito destes na inflamação e reabsorção óssea alveolar. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) inativadas pelo calor foram injetadas nos tecidos gengivais palatais adjacentes aos primeiros molares dos camundongos normais e knockout, e os grupos controle receberam o mesmo volume do veículo de suspensão (PBS). A severidade da reabsorção óssea foi quantificada por análise de μ CT. A inflamação foi avaliada por imunofluorescência, verificando-se presença e intensidade da coloração por marcadores de leucócitos (CD45) e neutrófilos (Ly6G). O número de osteoclastos foi determinado por TRAP e a expressão gênica de RANKL, MMP-13, TNF- α , IL-6 e IL-10 nos tecidos gengivais avaliada por RT-qPCR. A publicação 1 mostra uma reabsorção óssea inflamatória significativamente maior nos camundongos Ipaf-KO, sem diferenças, porém, no número de osteoclastos entre WT e Ipaf-KO. A expressão dos genes-alvo aumentou com a indução da doença periodontal, exceto de TNF α e IL-10, que foram altas nos animais Ipaf-KO mesmo em ausência da doença periodontal, podendo-se concluir que o inflamassomo NLRC4 teve um papel protetor na reabsorção óssea inflamatória neste modelo experimental. Na publicação 2 observamos que a severidade da reabsorção óssea não foi afetada pela ausência do inflamassomo NLRP3, mas foi significativamente reduzida nos camundongos Casp1-KO, sendo acompanhada nestes por um aumento significativo no número de osteoclastos. Não houve, no entanto, diferenças no infiltrado inflamatório ou na expressão dos genes-alvo, concluindo-se que NLRP3 não teve papel significativo na inflamação e reabsorção óssea, e caspase-1 contribuiu para a reabsorção óssea nas condições deste estudo.

Palavras-chave: Doença periodontal. Inflamação. Inflamassomos. Imunidade inata. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Rocha FRG. NLRC4 and NLRP3 inflammasome in periodontal disease induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

ABSTRACT

Inflammasomes are multi-protein complexes that can amplify the inflammatory signal in situations involving host-microbial interactions and host tissue destruction, such as chronic periodontal disease. There is a relative scarcity of information on the role of NLRC4 and NLRP3 inflammasomes in periodontal disease. In this study, we used a model of bacteria-initiated periodontal disease in WT, Ipaf-knockout (Ipaf-KO), Caspase 1-knockout (Casp1-KO) and NLRP3-knockout (NLRP3-KO) mice to describe the effect of those inflammasomes on inflammation and alveolar bone resorption. Heat-killed *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) were injected in the gingival tissues on the palatal aspect adjacent to first molars of wild-type (WT), Ipaf-KO, Casp1-KO and NLRP3-KO mice, and control animals received the suspension vehicle (PBS). Severity of bone resorption was quantitated by μ CT analysis. Inflammation was assessed by immunofluorescence, verifying the presence and intensity of a pan-leukocyte (CD45) and a neutrophil (Ly6G) markers. Osteoclast number was determined by TRAP and gene expression of RANKL, MMP-13, TNF- α , IL-6 and IL-10 in the gingival tissues was evaluated by RT-qPCR. In the first publication, μ CT analysis showed a significantly greater inflammatory bone resorption in Ipaf-KO mice; however there was no difference between WT and Ipaf-KO on osteoclast numbers of inflammatory infiltrate. Expression of candidate genes was also similarly increased by the induction of experimental periodontal disease, except for the expression of TNF- α and IL-10, which was already significantly higher in the gingival tissues of Ipaf-KO mice in the absence of experimental periodontal disease. We conclude that NLRC4 inflammasome has a protective role on inflammatory bone resorption in this experimental model. In the second publication we observed that severity of bone resorption was not affected by the lack of NLRP3 inflammasome, but it was reduced in Casp1-KO mice. Interestingly, the attenuation of alveolar bone resorption in Casp1-KO mice was accompanied by increase on the number of osteoclasts, whereas there were no significant changes on the inflammatory infiltrate or expression of candidate genes. The conclusion was that NLRP3 inflammasome does not play a significant role in induced inflammation and bone resorption and caspase-1 has a pro-resorptive role in these conditions.

Keywords: Periodontal disease. Inflammation. Inflammasome. Innate immunity. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 PROPOSIÇÃO	36
3 MATERIAL E MÉTODO	37
4 PUBLICAÇÃO 1	45
5 PUBLICAÇÃO 2	76
6 CONCLUSÃO	104
REFERÊNCIAS	106
ANEXO A – Certificado de Comitê de Ética	114

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças periodontais como modelo de estudo das interações microbiota-hospedeiro

As diferentes formas de doença periodontal destrutiva representam a lesão lítica de tecido ósseo mais prevalente na espécie humana (Pacios⁴⁰, 2012). Atualmente consideradas como infecções mediadas e moduladas pela resposta do hospedeiro, as doenças periodontais tem como agente etiológico extrínseco fundamental microrganismos do biofilme dental. As doenças periodontais proporcionam um modelo único para o estudo das interações microbiota-hospedeiro. Mais de 500 diferentes espécies microbianas podem ser encontradas no biofilme dental (Paster⁴², 2001) contudo apenas algumas são frequentemente associadas às doenças periodontais (Socransky^{49,50}, 1998, 1999). Assim, a cavidade bucal é continuamente colonizada por microrganismos não-patogênicos, de forma similar a outras superfícies mucosas, em especial a mucosa intestinal.

A discriminação entre espécies patogênicas e não-patogênicas requer mecanismos endógenos de regulação negativa da sinalização por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) para evitar o desenvolvimento de uma resposta imune exagerada e com consequências deletérias ao próprio hospedeiro. No entanto, é justamente a resposta imune desregulada e crônica a responsável pela maior parte da destruição tecidual característica de diversas doenças

inflamatórias, incluindo as doenças periodontais. Existem evidências sugerindo que a desregulação da resposta imune localizada no periodonto representa um dos principais mecanismos biológicos para a possível influência negativa das infecções periodontais sobre órgãos e sistemas à distância, como os sistemas cardiovascular, respiratório e reprodutivo (Prizzo⁴⁵, 2010), sendo este fato, se confirmado, suficiente para aumentar a relevância desta condição local para a saúde geral dos indivíduos.

Histologicamente, as doenças periodontais se caracterizam por um infiltrado inflamatório crônico, com predominância de linfócitos e macrófagos, porém com presença também de neutrófilos (Page⁴¹, 1976). A caracterização bioquímica das doenças periodontais é complexa devido a ausência de um consenso quanto aos critérios diagnósticos de atividade de doença. Assim, existem descrições na literatura de um desvio para um padrão de resposta Th1, Th2 e participação de células Th17 (Garlet¹⁸, 2010; Graves²⁰, 2011). Ainda que células T sejam consideradas as principais reguladoras da resposta imune nas doenças periodontais e também a principal fonte de RANKL no microambiente periodontal, existem evidências de que os linfócitos B também tem papel relevante na destruição tecidual associada às doenças periodontais (Eastcott,¹³ 1994; Teng⁵⁵ 1999; Baker¹ 1999; Kawai,²⁸ 2006). Mais recentemente, a polarização de macrófagos (M1/M2) presentes nos tecidos afetados por diferentes condições

infecciosas também tem sido relacionada com a destruição tecidual e desfecho clínico destas condições (Benoit⁶, 2008). De qualquer forma, existem abundantes informações sobre a expressão de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios nas doenças periodontais, como membros da família TNF, IL-1, INF, Cicloxigenases, Prostaglandinas e, coletivamente, estas informações indicam uma importante e complexa ativação da resposta imune (Yu⁶⁵, 2011; Graves²⁰, 2011).

Tradicionalmente dividida em imunidade inata e adaptativa, a resposta imune tem a função básica de proteger o organismo, sendo responsável pelo reconhecimento inicial do desvio da normalidade e/ou da presença de microrganismos. Este reconhecimento é mediado por células e receptores da resposta imune inata, os quais podem ativar a resposta imune adaptativa. Além de reconhecer agentes externos como microrganismos, seus fragmentos e fatores de virulência, por exemplo, os sensores da imunidade inata também reconhecem padrões moleculares derivados do próprio hospedeiro, que são indicativos de um desvio da homeostasia e, portanto, entendidos como sinais de perigo resultantes do dano e destruição tecidual. Estes são denominados padrões moleculares associados ao dano (DAMPs, *damage-associated molecular patterns*) (Pedra⁴⁴, 2009). No entanto, uma vez estabelecida a resposta imune em quadros inflamatórios crônicos, os braços inato e adaptativo da resposta imune estão continuamente ativos, e apresentam regulação recíproca. Estes dados estabelecem a doença periodontal como um

problema relevante Também como um importante modelo de estudo de condições envolvendo interações microbiota-hospedeiro e inflamação crônica.

1.2 Inflamassomos: sensores microbianos da resposta imune inata

Uma questão fundamental em Imunologia diz respeito ao início da resposta do hospedeiro à presença de microrganismos. A identificação de receptores específicos capazes de reconhecer diferentes ligantes microbianos, os padrões moleculares associados à microrganismos (MAMPS), representa um dos maiores avanços científicos no entendimento da resposta imune inata, reconhecido com o prêmio Nobel de Medicina em 2011.

Receptores de membrana com homologia ao gene Toll da mosca de fruta atuam como mediadores no reconhecimento de ligantes microbianos presentes no meio externo e também interno de diversos tipos celulares (receptores semelhantes à Toll, TLRs), em especial nas células participantes da resposta imune inata (Garlet¹⁸, 2010; Graves²⁰, 2011). Outros sensores moleculares da resposta imune inata vem sendo identificados, cujo papel não é redundante ao dos TLRs, como as proteínas com domínio de ligação a nucleotídeos e oligomerização (Nod) presentes no citosol e que apresentam como ligantes componentes derivados primariamente de microrganismos Gram-negativos (Nod1) ou derivados tanto de microrganismos Gram-positivos quanto Gram-negativos (Nod2). Estudo de nosso grupo de pesquisa em andamento

com apoio da FAPESP visa caracterizar o papel de Nod1 e Nod2 na reabsorção óssea associada à doença periodontal e os resultados obtidos até o momento indicam que Nod1 tem papel protetor, inibindo a reabsorção óssea associada à doença periodontal experimental. Estes sensores da imunidade inata são altamente conservados evolucionariamente, indicando sua relevância na resposta do hospedeiro.

Inflamassomos são uma família de complexos multiprotéicos citosólicos que participam no início e modulação da resposta imune iniciada por patógenos microbianos (MAMPs), além de sinais de dano tecidual (DAMPs) e grande número de espécies microbianas e fatores de virulência derivados de microorganismos (Yilmaz Lee⁶⁴, 2015). Estes complexos tem proteínas semelhantes à receptores Nod (NLR, *Nod-like receptors*) que incluem 22 proteínas citosólicas. Estas proteínas NLR representam o centro do complexo multiprotéico e dão o nome ao inflamassomo, como NLRP1, NLRP3 e NLRC4, por exemplo, que são os únicos inflamassomos com função fisiológica demonstrada até o momento (Jim²⁶ 2007). Além da proteína central NLR, os inflamassomos também incluem as proteínas caspase-1 e a proteína adaptadora denominada proteína semelhante à partícula associada à apoptose contendo um domínio CARD (ASC, *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*). A relevância do inflamassomo para a resposta imune é demonstrada pela associação entre mutações nos genes codificando proteínas componentes do complexo protéico e condições inflamatórias

autoimunes, como vitiligo, síndrome de Muckle-Wells e síndrome periódica associada à criopirina (cryopyrin-associated periodic syndrome, CAPS) (Hoffman²³, 2001; Valk⁶⁰, 2010). Outras condições associadas à desregulação da resposta imune, como as neoplasias, também estão associadas a alterações na ativação dos inflamassomos, incluindo câncer de pulmão (Hu²⁴, 2010). Em camundongos, a ativação de NLRC4 tem efeito preventivo em câncer de cólon, possivelmente por meio de modulação da proliferação e apoptose de células epiteliais da mucosa intestinal (Miao³⁸, 2010). Os diferentes inflamassomos são montados e ativados por diversos sinais exógenos e endógenos. Enquanto NLRP3 pode ser ativado por MAMPs e DAMPs, NLRC4 é ativado preferencialmente por MAMPs, incluindo DNA dupla-fita e proteínas bacteriana específicas. A proteína efetora dos inflamassomos é a protease caspase-1, que tem papel importante na morte celular (especificamente, por pirocitose) e também no processamento final de citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-18 e IL-33. Assim, o ganho de função com ativação constitutiva do inflamassomo e, conseqüentemente, de caspase-1 pode levar à exacerbação da resposta inflamatória, com aumento da secreção de IL-1 β ativa e aumento da apoptose; enquanto que a perda ou redução da função do inflamassomo pode atenuar a resposta inflamatória e inibir a resposta imune, reduzindo a capacidade do hospedeiro detectar e reagir aos MAMPs. A importância dos inflamassomos na resposta imune é demonstrada por mecanismos de

evasão desenvolvidos por diferentes microrganismos, como *S. typhimurium* e NLRC4 (Gong¹⁹, 2012).

Independentemente dos ativadores e ligantes específicos para NLRC4 e NLRP3, a doença periodontal, como uma condição inflamatória crônica, é caracterizada por altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e também por degradação tecidual, com acúmulo, portanto, de DAMPs no microambiente periodontal. Tanto ROS como DAMPs (os quais também podem gerar ROS) podem ativar outros inflamassomos além de NLRC4 e NLRP3, incluindo AIM2, NLRP1, NLRP6 (Yilmaz Lee⁶⁴, 2015). A ativação dos inflamassomos pode, então, ser proveniente de interações diretas do reconhecimento dos ligantes bacterianos pela proteínas/sensores centrais dos inflamassomos, ou também pode pela detecção de alterações celulares induzidas por estímulos microbianos ou estresse (Franchi²¹, 2012).

Coletivamente, estas informações indicam o papel relevante dos inflamassomos na resposta imune e sugerem que o melhor entendimento de suas funções biológicas e dos mecanismos biológicos envolvidos em sua ativação pode levar a novas estratégias de intervenção terapêutica direcionadas à modulação de vias reguladas pelos inflamassomos envolvidas na patogênese de diversas condições associadas à interações microbiota-hospedeiro e à inflamação crônica.

Especificamente no contexto da doença periodontal, há relativamente escassas informações disponíveis até o momento. Um

aumento na expressão gênica de NLRP3 e NLRP2, mas não de ASC-1, foi relatado em presença de doença periodontal em humanos, e estes níveis elevados foram relacionados a aumento de RNAm também das citocinas IL-1beta e IL-18, que são processadas pelos inflamassomos (Bostanci⁷, 2009). Elevada expressão de NLRP3 e AIM2 em tecido gengival de pacientes com doença periodontal já foi também correlacionado com níveis de IL-1beta e IL-18 também por outros autores, sugerindo uma possível participação de diversos inflamassomos na doença periodontal (Park⁴³, 2014; Ramos-Junior⁴⁶ 2015). Não foi encontrado, no entanto, até o momento nenhum estudo in vivo utilizando a indução de doença periodontal em modelos geneticamente modificados, o que evidencia o aspecto de interesse e novidade em nosso trabalho.

1.3 O inflamassomo NLRC4 (Ipaf)

Os principais MAMPs capazes de iniciar a ativação do NLRC4, também conhecido como Ipaf, são flagelinas bacterianas e proteínas componentes do sistema secretor bacteriano tipo III e IV, utilizado pelos microorganismos para injetar fatores de virulência nas células do hospedeiro (Figura 1). Estas proteínas são comuns a vários microorganismos Gram-negativos causadores de infecções graves, como *Yersinia spp* (peste e desordens gastrointestinais), *Shigella spp* (disenteria), *Salmonella spp* (febre tifóide), *Eschericia coli* (infecções

alimentares), *Legionella pneumophila* (pneumonia) e *Pseudomonas spp* (diversas infecções, incluindo doenças periodontais) (Jin¹⁵, 2007). A ativação de NLRC4 por patógenos representa o nível de sofisticação da resposta imune inata na detecção diferencial de patógenos e microrganismos comensais. Espécies comensais não patogênicas de *E. coli* presentes na flora intestinal devem ser distinguidas de *strains* da mesma espécie com fatores de virulência associados à doenças, como a *E. coli* enteropatogênica (EPEC). Recentemente, o sistema excretório tipo III do patógeno *Shigella flexneri* tem sido reconhecido como ativador indireto do inflamassomo NLRC4 (Suzuki⁵⁴, 2014). Forma-se um complexo de ativação do sistema complemento que pode induzir indiretamente a ativação dos inflamassomos, por alterações celulares associadas como a lise e alterações na concentração de cálcio do meio intracelular (Tirantafilou⁵⁷, 2015). A produção diferencial de citocinas inflamatórias como a IL-1 β e IL-18 por células da resposta imune inata em resposta à espécies patogênicas e não à espécies comensais envolve a ativação de inflamassomos (Miao³⁹, 2010), uma vez que estes complexos protéicos funcionam como mediadores do processamento final destas citocinas e podem modular a resposta adaptativa ao promoverem a polarização da resposta de linfócitos T auxiliares para um perfil Th1 e também a ativação de células *natural killer* (Dinarello¹², 2010).

Há evidências de que o inflamassomo NLRC4 tem funções efetoras únicas em diferentes tipos celulares. A ativação de NLRC4 em macrófagos

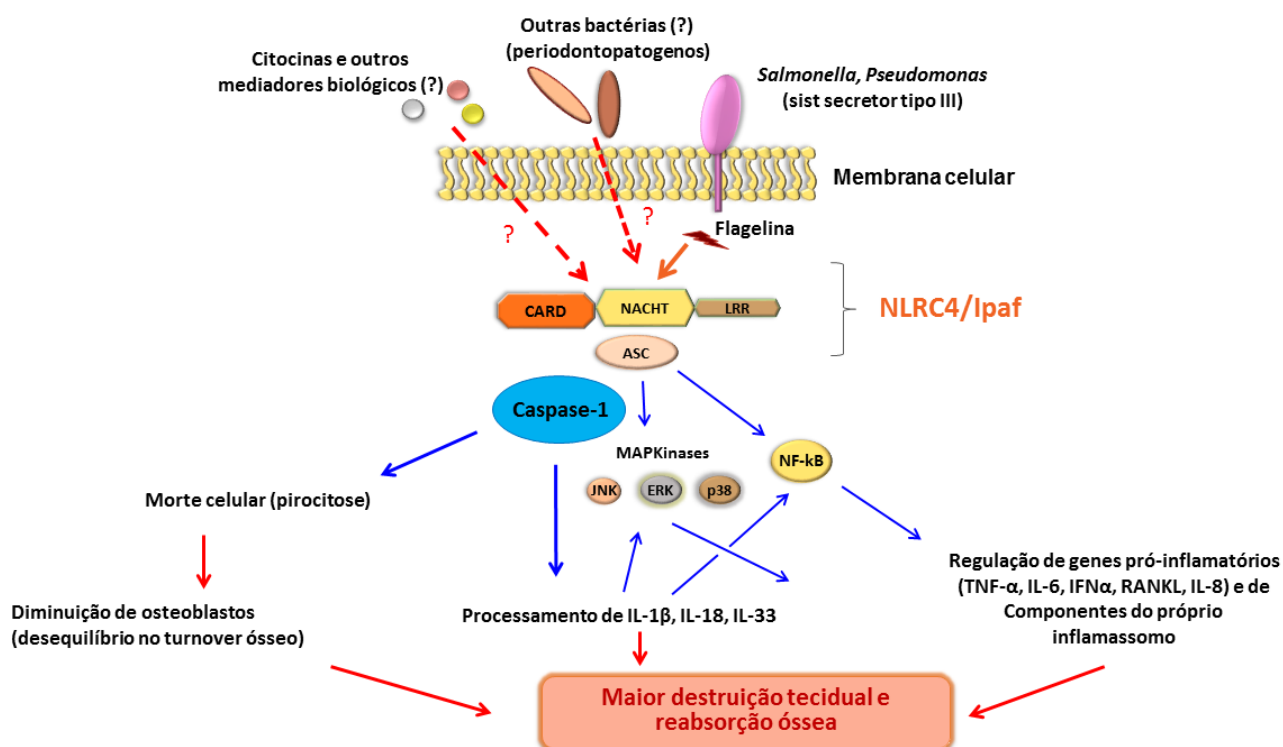
peritoneais em camundongos, por exemplo (mas não macrófagos derivados da medula óssea, resulta em aumento da produção de lipídeos pró-inflamatórios (Von Moltke⁶³, 2012). Há recentes relatos também de que a ativação de NLRC4 pode levar células epiteliais, mas não neutrófilos, a morte celular por piroptose (Vance⁶¹, 2015).

Tal ativação de NLRC4, assim como a de outros inflamassomos, tem como resultado o recrutamento e dimerização de caspase-1, necessária para sua ativação. Assim, caspase-1, que é a proteína efetora de NLRC4, bem como dos outros inflamassomos, é responsável tanto pela morte celular por pirocitose como pelo processamento final e ativação das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-18 e IL-33 (De Santis¹¹, 2013).

IL-1 β é a citocina inflamatória prototípica, com diversas ações biológicas importantes para a inflamação com a estimulação da proliferação de timócitos, da produção e liberação de collagenase e prostaglandinas e da diferenciação de osteoclastos, entre outras funções biológicas (Tripodi⁵⁸, 2011). IL-18 é outra citocina pró-inflamatória capaz de induzir a produção de interferon-gama por linfócitos T, polarizando a resposta para um padrão Th1 e também de ativar células *natural killer* (Schimitz⁴⁷, 2005) IL-33, por outro lado, estimula a produção de citocinas relacionadas ao padrão de resposta Th2 e inibe a produção de interferon-gama por células Th1 (Barksby², 2007) porém seu papel em condições inflamatórias crônicas é pouco conhecido (Figueiredo¹⁴,

2008). Maiores níveis de IL-18 (Becerik⁴, 2012) e IL-1 β (Sutterwala⁵², 2007) são associados à presença de doença periodontal. Não há informações específicas sobre o papel de IL-33 e caspase-1 na doença periodontal.

FIGURA 1 – Esquema representativo da ativação do inflamassomo NLRC4 por flagelinas bacterianas e proteínas componentes do sistema secretor bacteriano tipos III e IV, não sendo confirmadas ainda outras vias de ativação, como citocinas, outros mediadores biológicos, e periodontopatógenos, por exemplo.



Fonte: Elaboração Própria

1.4 O inflamassomo NLRP3 (Nalp3)

NLRP3 (ou Nalp3) é o inflamassomo mais extensamente estudado até o momento, e sua ativação em humanos envolve a associação da proteína central NLRP3, com duas proteínas contendo o domínio CARD (Cardinal e ASC), permitindo assim o recrutamento de duas unidades de Caspase-1 por interações CARD-CARD. Como não foi identificado um homólogo murino da proteína Cardinal, diferentemente dos humanos, acredita-se que a ativação de NLRP3 em roedores resulte no recrutamento de apenas uma molécula de caspase-1 (Sutterwala⁵³, 2006). Classicamente, a ativação do inflamassomo NLRP3 envolve interação microbiota-hospedeiro, via ativação de TLRs (Figura 2). A produção de IL-1 β e IL-18 por macrófagos infectados com *Staphylococcus aureus* ou *Listeria monocytogenes* é dependente de NLRP3 (Martinson³⁵, 2006). Como trata-se de um complexo multi-protéico localizado no citoplasma, inicialmente considerou-se que os inflamassomos seriam particularmente relevantes na defesa contra microrganismos e parasitas intracelulares. No entanto, macrófagos deficientes em NLRP3 estimulados com agonistas de TLR não produziram IL-1 β e IL-18 em virtude da não ativação de caspase-1, responsável pela clivagem e ativação destas citocinas. A relevância do NLRP3 foi confirmada in vivo, verificando que camundongos geneticamente deficientes foram mais resistentes ao choque endotoxêmico por injeção de LPS (Bostanci⁷, 2009). Além dos microrganismos, o inflamassomo NLRP3 pode ser

ativado por sinais endógenos de perigo de origem não microbiana (DAMPs), como por exemplo o ácido úrico presente em condições como a gota e também liberado por células necróticas (Bauernfeind³, 2009).

Especificamente em relação ao papel de NLRP3 em interações microbiota-hospedeiro nas doenças periodontais, ~~esta~~ já foram também relatadas, como quando foi investigada a expressão de diversos inflamassomos em células mononucleares em resposta a estímulo com *A. Actinomycetemcomitans*. Foi encontrado um nível elevado de NLRP3, bem como IL-1 β e IL-18 (Belibasakis⁵, 2012). *A. actinomycetemcomitans* também induziu secreção de IL-1 β e ativação de caspase-1 a partir da ativação do inflamassomo AIM2 em macrófagos THP-1 (Kim²⁹, 2016). Outro periodontopatógeno relacionado à ativação de NLRP3 e transcrição de IL-1 β foi *T. Denticola*, que por uma proteína de sua superfície, Td92, a qual interagiu diretamente com integrina $\alpha 5\beta 1$ para a ativação do inflamassomo NLRP3 e caspase-1, aumentando os níveis de IL-1 β em macrófagos (Jun²⁷, 2012).

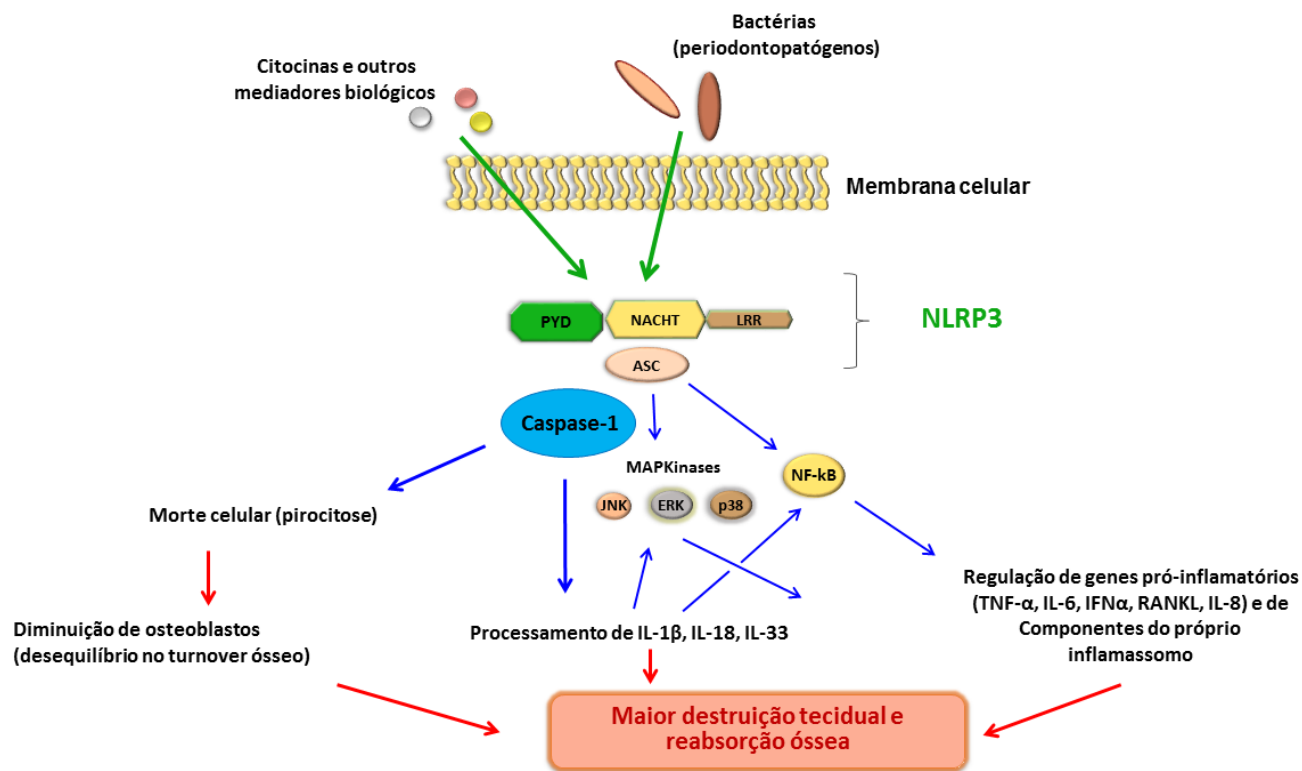
Estudos em humanos já relacionaram também o inflamassomo NLRP3 e doença periodontal. O estado de hiperglicemia mostrou ter exacerbado a inflamação pela ativação de NLRP3 em tecidos gengivais coletados pacientes com diabetes tipo 2 com periodontite. Maiores níveis de NLRP3 e IL-1 β foram encontrados em pacientes com ambas as doenças, e a inibição de NLRP3 contribuiu para diminuição de caspase-1 e IL-1 β (Huang ²⁵, 2015). Outro estudo em humanos demonstrou que a

expressão gênica de NLRP3 em biópsias de tecidos gengivais inflamados foi significativamente aumentada em comparação à observada em tecidos normais, estando diretamente correlacionada à expressão gênica de IL-1 β e IL-18 nestes tecidos. Estes autores verificaram ainda que o estímulo de macrófagos humanos in vitro com sobrenadantes de culturas de *Porphyromonas gingivalis*, bactéria Gram-negativa associada à doença periodontal, aumentou a expressão gênica de NLRP3, IL-1 β e IL-18. Assim, a ativação de NLRP3 pode requerer o estímulo de TLRs como iniciador/indutor da expressão dos componentes do inflamassomo, sendo este estímulo inicial via TLRs também responsável pela indução do substrato (pro-IL-1 β e pro-IL-18, por ex.) de ação do inflamassomo (Park⁴³, 2014). Mais recentemente, o aumento da expressão dos componentes do inflamassomo NLRP3 em tecidos gengivais inflamados foi confirmada em nível protéico e correlacionada positivamente com os níveis das citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α . In vitro, estes autores verificaram que macrófagos humanos estimulados com *P.gingivalis* vivos apresentaram aumento significativo da expressão protéica de NLRP3, a qual foi necessária para o aumento da ativação de caspase-1, mediando a ativação de IL-1 β e também a morte celular por pirocitose (Ciraci⁹, 2012). NLRP3 foi ativado também, além de via dependente de ATP (Mariathasan³³, 2006) após infecção com *P. gingivalis*, via sinalização de TLR2 e TLR4, levando a secreção de IL-1b e morte celular por piroptose (Park⁴³, 2014). Estes estudos sugerem novas abordagens da resposta

imune inata contra periodontopatógenos, sendo este um possível alvo para futuras estratégias no tratamento da doença periodontal.

Estes dados indicam que o inflamassomo NLRP3 tem importante papel na regulação da expressão de mediadores inflamatórios em situações envolvendo interações microbiota-hospedeiro e dano tecidual, sugerindo sua relevância em processos inflamatórios de natureza infecciosa como as doenças periodontais (Mariott³⁴, 2004; McCall³⁶, 2008).

FIGURA 2 – Esquema representativo da ativação já conhecida do inflamassomo NLRP3, por meio de interação microbiota-hospedeiro, via ativação de TLRs, levando à produção de IL-1 β e IL-18. NLRP3 pode ser ativado por sinais endógenos de perigo de origem não microbiana (DAMPs).



Fonte: Elaboração Própria

1.5 Inflamassomos e imunidade adaptativa

Clássica e didaticamente, a resposta imune é dividida em dois braços: inato e adaptativo. Os limites teórico-didáticos entre imunidade inata e adaptativa são questionáveis, no entanto, na medida em que células da resposta imune adaptativa apresentam PRRs funcionais, e também considerando a estreita interação e modulação recíproca dos dois tipos de resposta imune, especialmente em condições crônicas como artrite reumatóide e as doenças periodontais. O papel da ativação dos TLRs na modulação da resposta imune é extensamente estudado; no entanto, a questão óbvia, mas pouco explorada até o momento, é o papel dos inflamassomos na regulação da imunidade adaptativa.

A produção de citocinas é essencial para o estabelecimento da resposta imune inata competente e também para a subsequente ativação da imunidade adaptativa. Como já mencionado, citocinas como IL-1, IL-18 e IL-33 são processadas pelos inflamassomos e tem importante papel na polarização da resposta de linfócitos T CD4+ nos perfis Th17, Th1, e Th2, respectivamente (Kool³⁰, 2008; Lasiglie³¹, 2011). Uma sugestão do papel dos inflamassomos na imunidade adaptativa é derivada do modelo experimental de alergia respiratória em camundongos, que utiliza *alum* (mistura de alumínio e sais de magnésio), um ativador do inflamassomo NLRP3, como agente indutor da reação alérgica (Hoffman¹⁶, 2006; Gris²², 2010). Em modelo experimental de encefalite autoimune, camundongos geneticamente deficientes para

NLRP3 apresentaram redução na progressão da doença, que foi associada à menor produção de IL-18, IFN- γ e IL-17, indicando inibição da polarização da resposta Th1 e Th17 (Shaw⁴⁸, 2010). Outro estudo utilizando modelo de encefalite experimental demonstrou que a deficiência de caspase-1 (efetor comum dos inflamassomos) é relacionada à menor progressão da doença (Van de Veerdonk⁶², 2011), sugerindo um possível papel para outros inflamassomos além do NLRP3. Outras evidências do papel dos inflamassomos na modulação da imunidade adaptativa, incluem a resposta a microorganismos. Animais deficientes em caspase-1 são mais susceptíveis à infecção disseminada por fungos, a qual foi associada à inibição da polarização de células CD4+ nos perfis Th1 e Th17 (Tomalka⁵⁶, 2011). O inflamassomo NLRC4 também foi implicado na resistência à infecção por fungos (Li³², 2011). Assim, há ainda escassez de informações sobre o papel dos inflamassomos na modulação da imunidade adaptativa, em especial do inflamassomo NLRC4, porém as evidências disponíveis sugerem que a ativação destes complexos protéicos citoplasmáticos tem papel relevante na resposta do hospedeiro.

6 CONCLUSÃO

Considerando a falta de informações sobre o papel de NLRC4 no contexto da doença periodontal e também sua influência no turnover ósseo, este estudo traz novas informações, indicando que o inflamassomo NLRC4 desempenha um papel protetor na reabsorção óssea inflamatória. Há evidências, por exemplo, de que NLRC4 teria um papel único e distinto em diferentes tipos celulares (McCall³², 2008 e Vance³³, 2015). Com base na falta de influência da osteoclastogênese na severidade do infiltrado inflamatório e no aumento da expressão basal de TNF-alfa e IL-10, podemos especular possível papel do inflamassomo NLRC4 no efeito funcional em osteoclastos e células imunes.

Este também é o primeiro estudo que avalia o papel do inflamassomo NLRP3 e Caspase-1, proteína efetora de todos os inflamassomos, em um modelo de doença periodontal induzida por bactérias in vitro. NLRP3 não teve um papel significativo na inflamação e reabsorção óssea, enquanto que a falta de caspase-1 atenuou a reabsorção óssea inflamatória.

Utilizamos neste estudo animais com deleção global dos genes NLRC4, NLRP3 e Caspase-1. Embora não sejam encontrados na literatura evidências de vias alternativas compensatórias de diferentes inflamassomos e o possível alteração de sua ativação em nosso modelo experimental, é importante considerar as limitações deste modelo, no qual não há necessidade de colonização e interação bacteriana com células epiteliais da mucosa oral e gengiva. Apesar das limitações, este modelo induz

efetivamente a inflamação e reabsorção óssea alveolar, simulando assim as maiores características da doença periodontal em humanos, e tendo a vantagem de possibilitar grande controle da intensidade e frequência do estímulo indutor da doença.

Os resultados deste estudo ainda necessitam da finalização de experimentos in vitro que já tem sido feitos para aumentar o entendimento do papel de NLRC4 e NLRP3 na osteoclastogênese induzida por RANKL e atividade osteoclástica. Juntos, estes achados levarão a futuras investigações sobre o papel dos inflamassomos em condições inflamatórias crônicas associadas com a destruição tecidual.

REFERÊNCIAS*

1. Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC. CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun*. 1999; 67(6): 2804-9.
2. Barksby HE, Lea SR, Preshaw PM, Taylor JJ. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clin Exp Immunol*. 2007; 149(2): 217-25.
3. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol*. 2009; 183(2): 787-91.
4. Becerik S, Ozturk VO, Atmaca H, Atilla G, Emingil G. Gingival crevicular fluid and plasma acute- phase cytokine levels in different periodontal diseases. *J Periodontol*. 2012; 83(10): 1304-13.
5. Belisabakis GN, Xiong J, Miller VM, Li Y, Jayachandran M. Microvesicles at the crossroads between infection and cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012; 59(2): 124-32.
6. Benoit M, Desnues B, Mege JL. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol*. 2008; 181(6): 3733-9.
7. Bostanci N, Emingil G, Saygan B, Turkoglu O, Atilla G, Curtis MA, et al. Expression and regulation of the NALP3 inflammasome complex in periodontal diseases. *Clin Exp Immunol*. 2009; 157(3): 415-22.
8. Burstone, MS. Histochemical demonstration of acid phosphatases with naphthol AS-phosphates. *J Natl Cancer Inst*. 1958; 21(3):523-39.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca:
<http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

9. Ciraci C, Janczy JR, Sutterwala FS, Cassel SL. Control of innate and adaptive immunity by the inflammasome. *Microbes Infect.* 2012; 14(14): 1263-70.
10. de Aquino SG, Guimaraes MR, Stach-Machado DR, da Silva JA, Spolidorio LC, Rossa C, Jr. Differential regulation of MMP-13 expression in two models of experimentally induced periodontal disease in rats. *Arch Oral Biol.* 2009; 54(7): 609-17.
11. DeSantis DA, Ko CW, Liu X, Hise AG, Nunez G, Croniger CM. Alcohol-induced liver injury is modulated by Nlrp3 and Nlrc4 inflammasomes in mice. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 751374.
12. Dinarello CA. IL-1: discoveries, controversies and future directions. *Eur J Immunol.* 2010; 40(3): 599-606.
13. Eastcott JW, Yamashita K, Taubman MA, Harada Y, Smith DJ. Adoptive transfer of cloned T helper cells ameliorates periodontal disease in nude rats. *Oral Microbiol Immunol.* 1994; 9(5): 284-9.
14. Figueredo CM, Rescala B, Teles RP, Teles RP, Fischer RG, Haffajee AD, et al. Increased interleukin-18 in gingival crevicular fluid from periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23(2): 173-6.
15. Franchi L, Kamada N, Nakamura Y, Burberry A, Kuffa P, Suzuki S, et al. NLRC4-driven production of IL-1 β discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense. *Nat Immunol.* 2012; 13(5): 449-56.
16. Franchi L, Nunez G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1 β secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur J Immunol.* 2008; 38(8): 2085-9.
17. Garcia de Aquino S, Manzolli Leite FR, Stach-Machado DR, Francisco da Silva JA, Spolidorio LC, Rossa C, Jr. Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. *Life Sci.* 2009; 84(21-22): 745-54.

18. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res*. 2010; 89(12): 1349-63.
19. Gong YN, Shao F. Sensing bacterial infections by NAIP receptors in NLRC4 inflammasome activation. *Protein Cell*. 2012; 3(2): 98-105.
20. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*. 2011 Jan 17; 3; doi:10.3402/jom.v3i0.5304.
21. Greaney AJ, Leppla SH, Moayeri M. Bacterial Exotoxins and the Inflammasome. *Front Immunol*. 2015; 6: 570.
22. Gris D, Ye Z, Iocca HA, Wen H, Craven RR, Gris P, et al. NLRP3 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses. *J Immunol*. 2010;185(2): 974-81.
23. Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet*. 2001; 29(3): 301-5.
24. Hu B, Elinav E, Huber S, Booth CJ, Strowig T, Jin C, et al. Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(50): 2135-40.
25. Huang X, Yang X, Ni J, Xie B, Liu Y, Xuan D, Zhang J. Hyperglucose contributes to periodontitis: involvement of the NLRP3 pathway by engaging the innate immunity of oral gingival epithelium. *J Periodontol*. 2015; 86(2):327-35.
26. Jin Y, Mailloux CM, Gowan K, Riccardi SL, LaBerge G, Bennett DC, et al. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *N Engl J Med*. 2007; 356(12): 1216-25.

27. Jun HK, Lee SH, Lee HR, Choi BK. Integrin $\alpha 5\beta 1$ activates the NLRP3 inflammasome by direct interaction with a bacterial surface protein. *Immunity* 2012; 36(5): 755-68.
28. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol.* 2006; 169(3): 987-98.
29. Kim S, Park MH, Song YR, Na HS, Chung J. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induced Aim2 inflammasome activation is suppressed by xylitol in differentiated Thp-1 macrophages. *J Periodontol.* 2016 Feb 15: 1-16 [Epub ahead of print].
30. Kool M, Petrilli V, De Smedt T, Rolaz A, Hammad H, van Nimwegen M, et al. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol.* 2008; 181(6): 3755-9.
31. Lasigle D, Traggiai E, Federici S, Alessio M, Buoncompagni A, Assogli A, et al. Role of IL-1 beta in the development of human T(H)17 cells: lesson from NLRP3 mutated patients. *PLoS One.* 2011; 6(5):200-14.
32. Li Q, Yu H, Zinna R, Martin K, Herbert B, Liu A, et al. Silencing mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2 arrests inflammatory bone loss. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 336(3): 633-42.
33. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature.* 2006; 440(7081): 228-32.
34. Marriott I, Gray DL, Tranguch SL, Fowler VG Jr, Stryjewski M, Scott Levin L, et al. Osteoblasts express the inflammatory cytokine interleukin-6 in a murine model of *Staphylococcus aureus* osteomyelitis and infected human bone tissue. *Am J Pathol.* 2004; 164(4): 1399-406.

35. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006; 440(7081): 237-41.
36. McCall SH, Sahraei M, Young AB, Worley CS, Duncan JA, Ting JP, Marriot I. Osteoblasts express NLRP3, a nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat region containing receptor implicated in bacterially induced cell death. *J Bone Miner Res*. 2008; 23(1): 30-40.
37. McHugh KP, Shen Z, Crotti TN, Flannery MR, O'Sullivan RP, Purdue PE, Goldring SR. The role of cell-substrate interaction in regulating osteoclast activation: potential implications in targeting bone loss in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum*. 2010; 1 (1): 83-5.
38. Miao EA, Mao DP, Yudkovsky N, Bonneau R, Lorang CG, Warren SE. Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(7): 3076-80.
39. Miao EA, Warren SE. Innate immune detection of bacterial virulence factors via the NLRC4 inflammasome. *J Clin Immunol*. 2010; 30(4): 502-6.
40. Pacios S, Kang J, Galicia J, Gluck K, Patel H, Ovaydi-Mandel A, et al. Diabetes aggravates periodontitis by limiting repair through enhanced inflammation. *FASEB J*. 2012; 26(4): 1423-30.
41. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*. 1976; 34(3): 235-49.
42. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*. 2001; 183(12): 3770-83.
43. Park E, Na HS, Song YR, Shin SY, Kim YM, Chung J. Activation of NLRP3 and AIM2 Inflammasomes by *Porphyromonas gingivalis* Infection. *Infect Immun*. 2014; 82(1): 112-23.

44. Pedra JH, Cassel SL, Sutterwala FS. Sensing pathogens and danger signals by the inflammasome. *Curr Opin Immunol*. 2009; 21(1): 10-6.
45. Pizzo G, Guiglia R, Lo Russo L, Campisi G. Dentistry and internal medicine: from the focal infection theory to the periodontal medicine concept. *Eur J Intern Med*. 2010; 21(6): 496-502.
46. Ramos-Junior ES, Morandini AC, Almeida-da-Silva CL, Franco EJ, Potempa J, Nguyen KA, et al. A Dual Role for P2X7 Receptor during *Porphyromonas gingivalis* Infection. *J Dent Res*. 2015; 94(9): 1233-42.
47. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005; 23(5): 479-90.
48. Shaw PJ, Lukens JR, Burns S, Chi H, McGargill MA, Kanneganti TD. Cutting edge: critical role for PYCARD/ASC in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2010; 184(9): 4610-4.
49. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998; 25(2): 134-44.
50. Socransky SS, Haffajee AD, Ximenez-Fyvie LA, Feres M, Mager D. Ecological considerations in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* periodontal infections. *Periodontol 2000*. 1999; 20: 341-62.
51. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature*. 2012 (7381); 481: 278-86.
52. Sutterwala FS, Ogura Y, Szczepanik M, et al. Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity*. 2006; 24(3): 317-27.

53. Sutterwala FS, Ogura Y, Flavell RA. The inflammasome in pathogen recognition and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2007; 82(2): 259-64.
54. Suzuki S, Mimuro H, Kim M, et al. Shigella IpaH7.8 E3 ubiquitin ligase targets glomulin and activates inflammasomes to demolish macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111(40): 4254-63.
55. Teng YT, Nguyen H, Hassanloo A, Ellen RP, Hozumi N, Gorczynski RM. Periodontal immune responses of human lymphocytes in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-inoculated NOD/SCID mice engrafted with peripheral blood leukocytes of periodontitis patients. *J Periodontal Res.* 1999; 34(1): 54-61.
56. Tomalka J, Ganesan S, Azodi E, Patel K, Majmudar P, Hall BA, et al. A novel role for the NLRC4 inflammasome in mucosal defenses against the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2011; 7(12): 1071-9.
57. Triantafilou M, Hughes TR, Morgan BP, Triantafilou K. Complementing the inflammasome. *Immunology.* 2016; 147(2): 152-64.
58. Tripodi D, Maccauro G, Anogeianaki A, Castellani ML, Pandolfi F, Felaco P, et al. Impact of IL-18 on inflammation. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2011; 25(1): 7-11.
59. Trombetta-Esilva J, Yu H, Arias DN, Rossa C, Jr., Kirkwood KL, Bradshaw AD. LPS induces greater bone and PDL loss in SPARC-null mice. *J Dent Res.* 2011; 90 (4): 477-82.
60. Valk K, Vooder T, Kolde R, Reintam MA, Petzold C, Vilo J, et al. Gene expression profiles of non-small cell lung cancer: survival prediction and new biomarkers. *Oncology.* 2010; 79(3-4): 283-92.
61. Vance RE. The NAIP/NLRC4 inflammasomes. *Curr Opin Immunol.* 2015; 32:84-9.

62. van de Veerdonk FL, Joosten LA, Shaw PJ, Smeekens SP, Malireddi RK, van der Meer JW, et al. The inflammasome drives protective Th1 and Th17 cellular responses in disseminated candidiasis. *Eur J Immunol*. 2011; 41(8): 2260-8.
63. von Moltke J, Trinidad NJ, Moayeri M, Kintzer AF, Wang SB, van Rooijen N, et al. Rapid induction of inflammatory lipid mediators by the inflammasome in vivo. *Nature*. 2012; 490(7418): 107-11.
64. Yilmaz Ö, Lee KL. The inflammasome and danger molecule signaling: at the crossroads of inflammation and pathogen persistence in the oral cavity. *Periodontol 2000*. 2015; 69(1): 83-95.
65. Yu H, Li Q, Herbert B, Zinna R, Martin K, Junior CR, et al. Anti-inflammatory effect of MAPK phosphatase-1 local gene transfer in inflammatory bone loss. *Gene Ther*. 2011; 18(4): 344-53.

Não autorizo a reprodução do texto completo deste trabalho até 08/04/2018

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 08 de abril de 2016

Fernanda Regina Godoy Rocha