



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



VINICIUS IBIAPINA MASCARENHAS

CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES TECIDUAIS EM DOIS MODELOS
DE INDUÇÃO DE DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS

Araraquara

2014



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



VINICIUS IBIAPINA MASCARENHAS

**CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES TECIDUAIS EM DOIS MODELOS
DE INDUÇÃO DE DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para o título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Araraquara

2014

Mascarenhas, Vinicius Ibiapina

Caracterização das alterações teciduais em dois modelos de indução de doença periodontal experimental em camundongos / Vinicius Ibiapina Mascarenhas. - Araraquara: [s.n.], 2014.

70 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

1. Doenças periodontais 2. Porphyromonas gingivalis 3. Ligadura
I. Título

VINÍCIUS IBIAPINA MASCARENHAS

CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES TECIDUAIS EM DOIS MODELOS
DE INDUÇÃO DE DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Joni Augusto Cirelli

2º Examinador: Daniela Leal Zandim-Barcelos

3º Examinador: Rafael Silveira Faeda

Araraquara, 17 de Março de 2014.

DADOS CURRICULARES

VINÍCIUS IBIAPINA MASCARENHAS

NASCIMENTO: 25/08/1988

FILIAÇÃO: RISOLEIDA IBIAPINA MASCARENHAS

ROBERT COSTA MASCARENHAS

2006/2011 – Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Federal do Piauí – UFPI

2010/2011 – Aperfeiçoamento em Cirurgia Oral Menor pela Associação Brasileira de Cirurgiões Dentistas – ABCD/PI

2011/2013 – Curso de Especialização em Implantodontia pela Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em Odontologia – FAEPO

2012/2014 – Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Nível Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista – FOAr / UNESP

2013/2014 – Atualização em Dentística Estética Integrada pela Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em Odontologia - FAEPO

2013/2015 – Curso de Especialização em Periodontia pela Faculdade Herrero Unidade Avançada FAEPO.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os animais que contribuíram para o melhor entendimento das patologias e, conseqüentemente, pela busca constante por melhores tratamentos e melhoria da nossa saúde.

"A compaixão para com os animais é uma das mais nobres virtudes da natureza humana". - Charles Darwin.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Joni Augusto Cirelli, pela paciência, pelos conhecimentos passados em relação a pesquisa científica, pela compreensão nos momentos que precisei e por me chamar atenção nos momentos que eu faltei. Muito obrigado por ser sempre solícito, por fazer realmente seu papel de orientador, por sempre disponibilizar de tempo para me atender e me orientar na pesquisa, isso sim faz de você um excelente orientador. Peço desculpas se em algum momento deixei a desejar como orientado mas saiba que sempre procurei melhorar e sempre valorizei seus ensinamentos.

Agradeço a todos os participantes dessa pesquisa, que **direta ou indiretamente** contribuíram para o enriquecimento deste trabalho e sem dúvida para o fortalecimento da Odontologia baseada em evidências científicas. Obrigado pelos ensinamentos, conselhos, dicas, incentivos de todos vocês. Obrigado pela educação, disposição e por dedicar seu tempo a desenvolver esse projeto, sem a ajuda de cada um de vocês não seria possível a realização desse trabalho. Sem dúvida, com vocês adquiri conhecimentos que levarei para sempre fazendo o que cada dia me sinto mais feliz em fazer, pesquisar, buscando sempre a saúde bucal (e geral) de todos.

Lívia Finotti, Andressa, Erica, Claudinha, Leandro, Daniela Zandim-Barcelos, Morgana, Guilherme... obrigado a todos pela sua contribuição.

Muito obrigado à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro que me ajudou a desenvolver esse trabalho.

Muito obrigado à Faculdade de Odontologia de Araraquara e a Universidade Estadual Paulista, pelo apoio financeiro, pela estrutura física oferecida. Obrigado a

todos os funcionários desta faculdade e obrigado a todos os professores que contribuíram para meu crescimento como pessoa e como profissional.

Agradeço a Banca Avaliadora, que tem o importante papel de poder enxergar o que não enxergamos e de nos ajudar a melhorar ainda mais nosso trabalho, muito obrigado pela sua contribuição.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço especialmente ao Rafael Scaf de Molon.

Sem seu empenho e dedicação não seria possível realizar esse trabalho da maneira que foi realizado. Obrigado pelos conselhos, pelo incentivo em pesquisar, pelo estímulo em escrever, pelos ensinamentos tanto na parte laboratorial quanto na parte científica. Terei você como referência e exemplo em profissionalismo, dedicação e vontade. Você foi mais que um participante ativo da pesquisa foi um verdadeiro Co-Orientador e tem todo o meu respeito e minha admiração.

"Mesmo desacreditado e ignorado por todos, não posso
desistir, pois para mim, vencer é nunca desistir."

Albert Einstein

Mascarenhas VI. Caracterização das alterações teciduais em dois modelos de indução de doença periodontal experimental em camundongos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP; 2014.

RESUMO

A periodontite é uma doença infecciosa caracterizada por um processo inflamatório crônico do periodonto mediada e modulada pelo hospedeiro. Esta patologia resulta na destruição do tecido conjuntivo gengival e dos tecidos de suporte dos dentes. De modo a avaliar tanto a patogênese da doença periodontal quanto as diversas modalidades de tratamento, diferentes modelos animais de periodontite experimental têm sido propostos e utilizados. O benefício do uso destes modelos resulta no fato de que eles permitem uma avaliação da doença de uma forma longitudinal, com características de início e progressão semelhantes em diversos animais. O objetivo deste estudo foi caracterizar e avaliar comparativamente as alterações teciduais provocadas por dois modelos de doença periodontal experimental em camundongos: ligadura e gavagem oral. Para isto, foram utilizados 48 camundongos C57/BL6 wild type (WT), divididos em 4 grupos: Grupo C - Controle negativo, Grupo L – Ligadura (indução da doença periodontal por meio de ligaduras), Grupo G-Pg – Gavagem de *Porphyromonas gingivalis* (indução por meio de inoculações de Pg) e Grupo G-PgFn – Gavagem de *Porphyromonas gingivalis* + *Fusobacterium nucleatum*. Os animais foram sacrificados em dois períodos experimentais: 45 e 60 dias após o início da indução da doença periodontal. Observou-se perda óssea alveolar significativa apenas no grupo L, por meio de análise estereométrica, microtomografia computadorizada (μ CT) e imunohistoquímica. A colonização bacteriana nos grupos de gavagem foi confirmada por meio de PCR em

tempo real. Concluimos que o modelo de ligadura foi efetivo em induzir a doença periodontal nos parâmetros utilizados ao contrário da gavagem oral.

Palavras-chave: Doenças Periodontais, *Porphyromonas gingivalis*, Ligadura.

Mascarenhas VI. Characterization of tissue changes in two models of experimental induction of periodontal disease in mice [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP; 2014.

ABSTRACT

Periodontitis is an infectious disease characterized by a chronic inflammatory process of periodontal mediated and modulated by the host. This disease results in the destruction of connective tissue and supporting tissues of the teeth. In order to evaluate both the pathogenesis of periodontal disease and the various treatment modalities, different animal models of experimental periodontitis have been proposed and used. The benefit of using these models results in the fact that they allow an evaluation of a longitudinal disease with similar characteristics of start and progression in several animals. The aim of this study was to characterize and evaluate tissue changes caused by two models of experimental periodontal disease in mice: ligature and oral gavage. For this, 48 C57/BL6 mice wild type (WT) mice were divided into 4 groups: Group C - Negative Control, Group L - Ligature (induction of periodontal disease by ligatures), Group G-Pg - *Porphyromonas gingivalis* Gavage (induction by Pg inoculations) and Group G-PgFn - *Porphyromonas gingivalis* + *Fusobacterium nucleatum* Gavage. The animals were sacrificed at two experimental periods: 45 and 60 days after the induction onset of periodontal disease. Significant bone loss only in the group L by means of stereometric analysis, computed microtomography (μ CT) and immunohistochemistry was observed. The bacterial colonization in groups of gavage was confirmed by PCR in real time. We conclude that the model of ligature was effective in inducing periodontal disease parameters used in contrast to oral gavage.

Keywords: Periodontal Diseases, *Porphyromonas gingivalis*, Ligature.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
3	PROPOSIÇÃO	24
4	MATERIAL E MÉTODO	25
5	RESULTADO	39
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60
	ANEXOS	69

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença infecciosa caracterizada por um processo inflamatório crônico do periodonto mediada e modulada pelo hospedeiro. Esta patologia resulta na destruição do tecido conjuntivo gengival e dos tecidos de suporte dos dentes, sendo considerada a forma mais prevalente de patologia óssea nos seres humanos (Nahid et al.⁴⁹, 2011; Page et al.⁵², 1997). Na periodontite, o biofilme dental tem se mostrado como o fator etiológico primário no início da inflamação gengival e subsequente destruição dos tecidos periodontais (Haffagee, Socrasky²⁴, 1994). Patógenos periodontais presentes no biofilme produzem enzimas tais como, colagenases e proteases, com efeitos prejudiciais aos tecidos periodontais. Estas enzimas destroem o colágeno da matriz extracelular, as membranas das células do hospedeiro e produzem nutrientes para seu crescimento e posterior invasão tecidual (Kirkwood et al.³⁵, 2007; Kinane et al.³⁹, 2005).

A permanência de um foco infeccioso em íntima associação aos tecidos periodontais leva à ativação e manutenção de uma resposta imune-inflamatória com caráter crônico local. Tal resposta resulta na destruição tecidual por meio de mecanismos que incluem a produção de citocinas, quimiocinas e enzimas envolvidas na degradação de tecido conjuntivo e da expressão de fatores de diferenciação e ativação de osteoclastogênese. De modo a avaliar tanto a patogênese da doença periodontal quanto as diversas modalidades de tratamento, diferentes modelos animais de periodontite experimental têm sido propostos e utilizados (Graves et al.²¹, 2008). O benefício do uso destes modelos resulta no fato de que eles permitem uma avaliação da doença de uma forma longitudinal, com características de início e progressão semelhantes em diversos animais, além de permitir análises da composição celular e molecular dos tecidos envolvidos (Graves et al.²¹, 2008).

Entre as desvantagens de modelos de animais de pequeno porte está o fato de não apresentarem a mesma microbiota oral humana, algumas linhagens serem naturalmente resistentes à periodontite e a dificuldade na realização de determinados experimentos e até mesmo a disponibilidade de tecidos para análise, devido ao tamanho reduzido do animal. Embora alguns animais de grande porte como cães ou primatas não-humanos apresentem características de dentes e flora bucal similares aos humanos, esses modelos experimentais possuem restrições éticas, menor disponibilidade de animais e custos elevados das pesquisas, dificultando ou mesmo inviabilizando alguns estudos (Oz, Puleo⁵¹, 2011).

A variabilidade de modelos encontrada na literatura impede, muitas vezes, uma comparação direta entre os resultados e conclusões dos diferentes estudos. Portanto, trabalhos que avaliem comparativamente a progressão e características celulares e moleculares dos diferentes modelos de indução da periodontite podem ser úteis na escolha do modelo a ser utilizado e na interpretação dos resultados encontrados na literatura por estudos prévios.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Microbiologia da Doença Periodontal

Socransky et al.⁶³ (1998) examinaram as relações existentes entre as espécies bacterianas na placa subgingival com a doença periodontal crônica por meio do método *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Os autores avaliaram 13.261 amostras de placa subgingival e agruparam as espécies bacterianas em complexos: Complexo vermelho, (*P. gingivalis*, *T. forsythensis* e *T. denticola*) Complexo laranja, (*F. nucleatum*, *F. periodonticum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *Micromonas micros*, *Campylobacter showae*, *C. rectus*, *Campylobacter gracilis*, *Eubacterium nodatum* e *Streptococcus constellatus*) Complexo verde, (*Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigen*, *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans*) Complexo amarelo, (*Streptococcus - Streptococcus mitis*, *S. sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius*) e Complexo roxo, (*A. odontolyticus* e *Veillonella parvula*). Os autores deste estudo observaram que algumas colônias de bactérias podem preceder outras; por exemplo, o complexo laranja antecede a colonização do complexo vermelho, e isto pode explicar a sequência evolutiva da doença periodontal. Também foram observadas as relações existentes entre certos complexos bacterianos e aspectos clínicos da doença periodontal. Os parâmetros de profundidade à sondagem e sangramento à sondagem, por exemplo, mostraram relação direta com a presença das espécies do complexo vermelho e, em certa extensão, do complexo laranja.

Lopez et al.⁴³ (2004) reportaram elevados níveis de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, ou seja, bactérias do complexo vermelho em indivíduos portadores de periodontite crônica. Em concordância, Socransky, Haffajee⁶² (2005) identificaram as

bactérias *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tanarella forsythia* como os patógenos periodontais comumente encontrados em biofilmes subgingivais de indivíduos adultos com doença periodontal. Aumento do número de outras espécies de bactérias, como: *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Prevotella spp.*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus intermedius* e *Fusobacterium nucleatum*, tem sido observado em bolsas periodontais profundas e a presença destes micro-organismos está diretamente relacionada com aumento de profundidade de sondagem e perda de inserção (Kesavalu et al.³¹, 2007).

Considerável atenção tem sido dada à *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, bactérias estas, associadas com a periodontite crônica e periodontite agressiva localizada, respectivamente (Holt, Ebersole²⁸, 2005). Faveri et al.¹⁵ (2009) descreveram a microbiota subgingival em indivíduos portadores de periodontite agressiva localizada e compararam com a microbiota de indivíduos com periodontite crônica generalizada e de indivíduos periodontalmente saudáveis. As conclusões apresentadas mostraram associação do *A. actinomycetemcomitans* com doença periodontal agressiva e localizada, e outras espécies bacterianas, tais como *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *C. gracilis*, *E. nodatum* e *P. intermédia* representando importante papel na progressão da doença. Bactérias periodontopatogênicas como *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* possuem múltiplos fatores de virulência que estão envolvidos na etiologia da doença periodontal.

Holt, Ebersole²⁸ (2005) dentre outros autores, consideraram a *Porphyromonas gingivalis* como o micro-organismo desencadeante do processo ativo da doença periodontal. Contudo, evidências mostram que as interações entre diferentes espécies bacterianas, são importantes fatores na patogênese da doença periodontal (Gyorfi et

al.²³, 1994). Como exemplo, o *Fusobacterium nucleatum*, comumente encontrado no biofilme subgingival de bolsas periodontais, participa das reações de adesão e co-agregação com outros patógenos, como a *P. gingivalis*. Sinergismo patogênico entre *P. gingivalis* e *F. nucleatum* em modelos animais foi anteriormente relatado por, Baumgartner et al.⁵ (1992), Feuille et al.¹⁷ (1996) e Ebersole et al.¹⁴ (1997). Todos estes estudos indicaram que houve maior patogenicidade do inóculo misto destas cepas bacterianas em comparação à inoculação singular. Estas observações clínicas e resultados experimentais sugerem que interações entre *P. gingivalis* e *F. nucleatum* poderiam ter uma grande influência sobre a sobrevivência e patogenicidade bacteriana.

Modelos Experimentais da Doença Periodontal

Modelos experimentais em pesquisa podem ser definidos como a materialização de uma parte da realidade. Assim, devem apresentar uma precisão adequada, por meio de comprovação prévia e pela demonstração das limitações em relação à realidade que irá representar (Faveri et al.¹⁵, 2009).

O desenvolvimento de modelos experimentais torna-se importante na medida em que estes auxiliam na compreensão da origem e da evolução da patologia nos seres humanos. Nas ciências médicas, permitem o melhor conhecimento da fisiologia, da etiopatogenia das doenças, da ação de medicamentos ou dos efeitos das intervenções cirúrgicas (Tonetti et al.⁶⁵, 2005). A maior importância dos modelos experimentais está relacionada ao respeito à barreira ética de não intervenção primária experimental em humanos. Deste modo, o uso de modelos animais em pesquisa periodontal é um passo necessário antes de ingressar em experimentações clínicas com novas terapias de tratamentos. Neste sentido, o modelo experimental deve ser

funcionalmente o mais semelhante possível ao que se objetiva estudar (Hochman et al.²⁶, 2005).

Estudos longitudinais de doenças periodontais em humanos possuem dificuldades na avaliação dos mecanismos da doença, uma vez que existem muitas variáveis de difícil controle entre os pacientes como nível de atividade, susceptibilidade, progressão e o tempo da presença da doença (Dumitrescu et al.¹³, 2004). Por conseguinte, estudos em humanos são limitados pela dificuldade em estabelecer relações causais entre os diversos fatores e a destruição periodontal na presença da doença.

Os modelos animais devem, obrigatoriamente, permitir a avaliação de fenômenos biológicos naturais, induzidos ou comportamentais, que possam ser comparados aos fenômenos humanos em questão (Ferreira, Ferreira¹⁶, 2003). Contudo, encontrar um modelo animal de doença periodontal, que reproduza todos os aspectos da doença humana é uma meta impossível (Genco et al.²⁰, 2005).

A seleção de um modelo experimental é determinada pelo objetivo da pesquisa científica. O uso de grandes animais como macacos e cães devem ser reservados para a última fase de validação de novos tratamentos, antes da utilização em humanos. Na maioria dos casos são utilizados modelos experimentais com pequenos animais, como ratos e camundongos (Struillou et al.⁶⁴, 2010).

Os camundongos apresentam algumas características comparáveis à doença humana como a incidência da doença periodontal e a suscetibilidade à indução experimental de doença periodontal (Wiebe et al.⁶⁷, 2001). Ao mesmo tempo, os camundongos apresentam custo relativamente baixo, são de fácil manejo, os processos inflamatórios e imunológicos são extensamente estudados e bem conhecidos e as características genéticas são prontamente manipuláveis.

A indução da doença periodontal em ratos e/ou camundongos tem sido realizada por vários métodos, com destaque para a colocação de ligadura que vai atuar como um nicho para colonização bacteriana (Klausen et al.³⁶, 1991), introdução de micro-organismos patogênicos por meio de gavagem (Fiehn et al.¹⁸, 1992) e por meio de injeções de bactérias inativadas (Bezerra et al.⁷, 2002) ou LPS bacteriano (Klausen et al.³⁶, 1991). Muitos destes modelos de doença periodontal experimental não foram totalmente caracterizados em termos de sua evolução temporal da inflamação, das alterações macroscópicas e das características histológicas. Também, estudos que comparem os diferentes modelos nestes diferentes aspectos são escassos.

Modelos Experimentais

Ligadura

A doença periodontal induzida por ligadura em ratos foi descrita em 1966 (Rovin et al.⁵⁶, 1966) e é atualmente considerada um dos modelos mais utilizados em pesquisas periodontais. Um fio de algodão, seda ou nylon é colocado na área cervical dos molares maxilares ou mandibulares de ratos para induzir grande acúmulo de placa e ulceração do epitélio do sulco. A placa aderida sobre o fio facilita a invasão para o tecido conjuntivo e leva a alterações no tecido periodontal similares às observadas em periodontites humanas, como ruptura e migração apical do epitélio juncional, influxo de células inflamatórias e perda das fibras do ligamento periodontal e destruição óssea (Klausen et al.³⁶, 1991).

Em ratos, a perda dos tecidos de inserção e perda óssea ocorre previsivelmente em um período de 7 dias (Bezerra et al.⁷, 2002). Assim como na periodontite em humanos, a perda óssea alveolar nos modelos de ligadura é dependente da presença de bactérias. A composição de biofilmes acumulados ao redor da ligadura foi avaliada

em ratos e após 42 dias, foi observada a presença de varias espécies bacterianas comumente encontradas em humanos, como a *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* (Duarte et al.¹², 2010).

Em ratos livres de microrganismos (gnotobióticos), a colocação de ligaduras não induz a uma significativa inflamação gengival ou perda óssea (Rovin et al.⁵⁶, 1966), igualmente como a utilização de antimicrobianos reduz a perda de inserção e a reabsorção óssea, confirmando o papel das bactérias no início e na progressão da destruição tecidual nestes modelos (Kenworthy, Baverel³⁰, 1981). Seguindo este raciocínio, porém visando uma indução mais rápida e evidente da doença periodontal, alguns pesquisadores optam pela colocação de ligaduras embebidas em bactérias periodontopatogênicas (Li, Amar⁴¹, 2007; Kimura et al.³³, 2000; Yuan et al.⁷⁰, 2011). A destruição tecidual que ocorre em modelos de ligadura, assim como na doença periodontal em humanos, é associada à resposta do hospedeiro, que é expressa com a formação de um infiltrado inflamatório na gengiva antes da reabsorção óssea (Gyorfi et al.²³, 1940).

A relevância do modelo de ligaduras em ratos tem sido questionada com a justificativa de que a lesão mecânica do segmento poderia agravar a destruição periodontal. Além disso, a perda óssea causada pela remodelação óssea fisiológica em ratos tem sido considerada como outra desvantagem de modelos de periodontite induzida experimentalmente para os modelos de ligadura (Hoffman, Schour²⁷, 1940; Kuhr et al.³⁷, 2004).

Modelos de ligadura são considerados modelos que desencadeiam doença periodontal aguda já que a destruição óssea é rápida e severa e, tipicamente mostra perda de inserção acima de 50%, em um período entre uma a duas semanas

(Karimbux et al.²⁹, 1998). Após este período, é esperado uma diminuição na intensidade da destruição tornando-se uma reação crônica.

Gavagem Oral

A introdução de cepas de bactérias humanas por gavagem oral e o subsequente impacto sobre o periodonto têm sido estudados em vários modelos de roedores (Klausen et al.³⁶, 1991). A gavagem oral é utilizada para estabelecer o desenvolvimento de vacinas e para analisar o impacto dos diferentes componentes das respostas do hospedeiro.

Vários foram os investigadores que utilizaram este modelo para tentar reproduzir a perda óssea em doença periodontal. Um modelo experimental de periodontite foi desenvolvido com a introdução de cepas de *P. gingivalis* em ratos para induzir a perda óssea alveolar (Baker et al.², 1999; Lalla et al.³⁸, 1998). Posteriormente, este modelo foi replicado utilizando outros patógenos, incluindo *A. actinomycetemcomitans* (Garlet et al.¹⁹, 2006), *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas gulae*, um periodontopatógeno encontrado em animais equivalente a *P. gingivalis* em humanos (Hardham et al.²⁵, 2005). A perda óssea substancial, normalmente, demora mais de quatro semanas e é mensurado histologicamente por análise morfométrica ou por tomografia computadorizada (Garlet et al.¹⁹, 2006; Wilensky et al.⁶⁸, 2005).

Dada a confirmação da patogenicidade, em camundongos, de grande quantidade de micro-organismos da microbiota oral humana, algumas das bactérias periodontopatogênicas que podem ser utilizadas na indução experimental da doença periodontal são *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* (Klausen et al.³⁶, 1991). Um modelo de indução foi desenvolvido para examinar doença periodontal

polimicrobiana utilizando as bactérias *P. gingivalis*, *T. forsythia*, e *T. denticola*. Além disso, a colonização, as características da infecção causada por esses organismos e as interações sinérgicas foram avaliadas (Kesavalu et al.³¹, 2007). Os autores concluíram que a infecção polimicrobiana apresentou significativo aumento nos níveis de anticorpo IgG e maior quantidade de perda óssea com ou sem a presença do *F. nucleatum* e que essas bactérias exibem sinergismo entre si resultando em aumento na virulência e na reabsorção óssea imuno-inflamatória. O efeito da infecção oral com *P. gingivalis*, *F. nucleatum* ou ambas foi determinado em tecidos periodontais e a infecção mista (*P. gingivalis*, *F. nucleatum*) apresentou características mais destrutivas que a mono infecção (Polak et al.⁵⁴, 2009).

Contudo, devido à complexidade deste modelo, há casos em que os resultados devem ser interpretados com cautela visto que as diferenças genéticas de camundongos poderiam afetar diversos parâmetros incluindo colonização, invasão, eventos destrutivos e reparação tecidual (Tonetti et al.⁶⁵, 2005).

Esta metodologia foi utilizada com sucesso para o estabelecimento de uma relação entre a indução de doença periodontal com *P. gingivalis* e condições sistêmicas. Por exemplo, infecção oral por *P. gingivalis* em camundongos hiperlipidêmicos acelera a formação de placas ateroscleróticas (Lalla et al.³⁹, 2003). Além disso, a indução de perda óssea alveolar por *P. gingivalis* é aumentada em ratos diabéticos desde que o receptor final da glicação avançada (RAGE) seja bloqueado (Lalla et al.³⁸, 1998; Lalla, et al.³⁹, 2003). A utilização de modelos de gavagem oral para tratar uma grande variedade de hipóteses relacionadas à patogênese periodontal, foi avaliada variando o papel da resposta do hospedeiro às características de virulência de periodontopatógenos suspeitos e a interligação destes fatores com os parâmetros sistêmicos (Graves et al.²¹, 2008).

Não obstante, com esta breve revisão, verificamos que cada modelo tem características próprias, havendo escassez de estudos na literatura que comparem diferentes modelos de indução de doença periodontal experimental, quanto à sua progressão e danos causados aos tecidos periodontais. Estudos neste sentido permitem caracterizar melhor os diferentes modelos e auxiliam na escolha do modelo a ser empregado em experimentos pré-clínicos em modelos animais, de acordo com seu propósito.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi caracterizar e avaliar comparativamente as alterações teciduais provocadas por dois modelos de doença periodontal experimental em camundongos: ligadura e gavagem oral.

Objetivos específicos:

- Avaliar a destruição óssea alveolar produzida pelos diferentes modelos de indução de doença periodontal, por meio de análise histométrica (medidas lineares e de área) e por microtomografia computadorizada (medidas volumétricas e lineares).
- Avaliar a intensidade do processo inflamatório provocado nos tecidos periodontais pelos diferentes métodos de indução de doença periodontal, por meio de análise histológica estereométrica.
- Avaliar e quantificar a presença de osteoclastos no osso alveolar, por meio de imunohistoquímica.
- Avaliar a ocorrência da colonização bacteriana por *Porphyromonas gingivalis*, por meio da extração de DNA e qPCR, a partir de amostras de tecido gengival.

4 MATERIAL E MÉTODO

Obtenção e Manutenção de Animais

Foram utilizados camundongos C57/BL6 wild type (WT), fêmeas, com idade aproximada de 8 semanas e com peso médio de 25g. Estes animais foram obtidos junto ao biotério da Área de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, onde foram criados e posteriormente mantidos no biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, de acordo com o Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e o Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP sob número 13/2012 (Anexo). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas limpas, em temperatura controlada (22-25°C), com ciclos de claro e escuro (12:12h), alimentados com ração granulada (Labina/Purina) e água ad libitum.

Delineamento Experimental

O número de animais utilizados foi determinado a partir dos períodos experimentais propostos, considerando 48 animais distribuídos em 4 grupos experimentais seguindo os períodos de sacrifício: 45 e 60 dias após o início da indução da doença. A escolha destes intervalos foi baseada nos estágios de desenvolvimento da doença periodontal, com alterações no perfil de citocinas e mediadores da resposta inflamatória/imune, de acordo com estudos prévios (de Molon et al.⁴⁷, 2014), realizados em ratos, nos quais se empregou o método de indução da doença periodontal por meio de ligadura. Assim, o período de 45 e 60 dias foram

considerados representativos de doença crônica instalada, nos quais esperava-se observar níveis variados de destruição periodontal, de acordo com o modelo utilizado.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo C – Controle negativo: animais não receberam nenhum tratamento durante todo o período experimental.
- Grupo L – Ligadura: indução da doença periodontal por meio de ligaduras, colocadas ao redor dos primeiros molares superiores.
- Grupo G-Pg – Gavagem de *Porphyromonas gingivalis*: indução da doença periodontal por meio de inoculações de *Pg* acrescido de 2% de carboximetilcelulose na cavidade oral dos animais, com intervalos de 2 dias entre elas, num total de 5 inoculações. (Cantley et al.⁹, 2011; Bendyk et al.⁶, 2009)
- Grupo G-PgFn – Gavagem de *Porphyromonas gingivalis* + *Fusobacterium nucleatum*: indução de doença periodontal por meio de inoculações de *Pg* e *Fn* acrescido de 2% de carboximetilcelulose na cavidade oral dos animais, com intervalos de 2 dias entre elas, num total de 5 inoculações. (Bendyk et al.⁶, 2009)

Indução de Doença Periodontal

Neste estudo, foram utilizados 2 modelos de indução de doença periodontal, descritos a seguir:

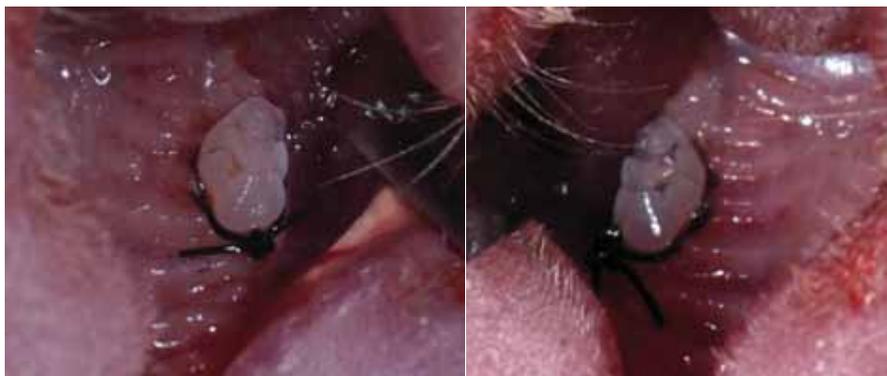
Ligadura: para a colocação da ligadura, os animais foram submetidos à anestesia geral (0,10 mL de Ketamina e 0,05 mL de cloridrato de Xilasina por 100g de peso corporal) e em seguida posicionados em mesa operatória apropriada (Figura

1), para permitir a manutenção adequada da abertura bucal dos camundongos, facilitando o acesso aos dentes na região posterior da maxila. O modelo de ligadura foi obtido com a colocação de um fio de sutura 6.0 de nylon ao redor dos primeiros molares superiores bilateralmente (Figura 2). Neste modelo de indução de doença periodontal, o acúmulo de micro-organismos viáveis ao redor da ligadura implica na participação de diferentes antígenos ou padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), como toxinas e produtos do metabolismo microbiano, DNA, flagelos e peptidoglicanos. As ligaduras foram checadas periodicamente e reposicionadas, se necessário.

Figura 1 - Mesa operatória e animal posicionado para permitir uma manutenção adequada da abertura bucal e de visibilidade, facilitando o acesso aos dentes da região posterior da maxila.



Figura 2 - Ligadura com fio de nylon 6.0 colocada ao redor dos primeiros molares maxilares, com auxílio de instrumental adequado, para permitir a indução da doença periodontal experimental.



Inoculação bacteriana: O protocolo de inoculação bacteriana foi utilizado nos grupos G-Pg e G-PgFn. As bactérias *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) e *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586) (Nagayama et al.⁴⁸, 2001; Saito et al.⁵⁸, 2008) foram provenientes do Departamento de Patologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP. Resumidamente, *Porphyromonas gingivalis* foi cultivada em meio ágar sangue (Brain Heart Infusion - BHI – Himedia; sangue desfibrinado de carneiro 5%) suplementado com 1µL/mL de menadiona, 5µL/mL de hemina, de modo a suprir as necessidades nutricionais e mantidas em câmara de anaerobiose (Don Whitley - Inglaterra) contendo 90% de N₂ e 10% de CO₂ a 37°C por 10 dias (Kim et al.³², 2012; Lee et al.⁴⁰, 2011; Rimondini et al.⁵⁵, 2002; Shemesh et al.⁶⁰, 2010). A pureza das colônias foi confirmada por meio do método de reação de polimerase em cadeia (PCR). A curva de crescimento de ambos os micro-organismos foi realizada para conhecer a fase log ou exponencial, determinar a densidade óptica (600nm) e conhecer a concentração dos micro-organismos em UFC/ml (unidades formadoras de colônias por mililitro). Passados 48 horas do repique em placa, 6 alçadas de colônias foram transferidas para um tubo falcon contendo 15 ml de BHI caldo suplementado com hemina e menadiona e mantidos em anaerobiose por 48 horas. Na sequência, 900µl da solução foram transferidos para um novo tubo falcon contendo 8 ml de BHI caldo também suplementado com hemina e menadiona e mantidos em anaerobiose até o momento determinado pela curva de crescimento. Nesta etapa, as células estão plenamente adaptadas, absorvendo os nutrientes, sintetizando os constituintes, crescendo e se duplicando. No momento que antecede a fase estacionária dos micro-organismos: 13 horas para o *Fn* e 35 horas para a *Pg*, ambos na concentração de 1×10^7 UFC (unidades formadoras de colônias), 50µl do tubo contendo a *Pg* e 50µl do *Fn* foram transferidos para um novo tubo, conferindo

um volume total de 100µl para os grupos de gavagem *Pg + Fn* e 100µl de *Pg* para os grupos de gavagem apenas com *Pg*.

Os grupos de animais infectados foram submetidos ao protocolo que consiste da inoculação oral de 10^7 UFC em 100 µl (Figura 3), acrescida de 2% de carboximetilcelulose, sendo esta solução aplicada diretamente na cavidade oral dos animais com o auxílio de um micropipetador onde foram feitas 5 inoculações nos animais. Concomitantemente, os micro-organismos foram também plaqueados em cultura de ágar sangue e mantidos em anaerobiose por 10 dias para confirmar a viabilidade das bactérias utilizadas para inoculação. (Bendyk et al.⁶ 2009; Cantley et al.⁸ 2009; Cantley et al.⁹ 2011)

Figura 3 – Inoculação bacteriana pelo método de gavagem. Os animais eram imobilizados e a solução contendo as bactérias era aplicada diretamente na cavidade oral, com o auxílio de uma micropipeta. Imagem apenas ilustrativa, não corresponde ao volume utilizado.



Coleta de Material e Análises

Após 45 e 60 dias do início do experimento, 6 animais de cada grupo foram sacrificados por overdose do anestésico. Posteriormente ao sacrifício, a maxila dos animais foi removida e separada em duas hemi-arcadas por corte na região da sutura palatina, totalizando 12 peças/grupo/período. Seis peças foram utilizadas para processamento histológico e as peças restantes utilizadas para microtomografia computadorizada (μ CT) e obtenção de material para a análise de PCR (Polymerase Chain Reaction) em tempo real.

As peças destinadas à análise histológica foram fixadas em paraformol 4% por 24h, descalcificadas em EDTA (0.5M, pH8.0) durante 4-5 semanas (com troca de solução 3X por semana) e, em seguida, incluídas em parafina. Cortes seriados de 4 μ m de espessura foram obtidos no plano mesio-distal, montados 3 cortes sequenciais por lâminas e corados com hematoxilina e eosina (H/E). Estes cortes foram utilizados para avaliação das seguintes análises:

- Avaliação do processo inflamatório por histologia estereométrica
- Avaliação histométrica da perda óssea alveolar na área de furca dos primeiros molares e área interproximal.entre o primeiro e segundo molar
- Análise imunohistoquímica para identificação de osteoclastos (células multinucleadas TRAP+ presentes na superfície óssea)

As outras hemi-arcadas foram utilizadas para a seguinte análise:

- qPCR (PCR em tempo real): expressão gênica de *Pg*
- Microtomografia Computadorizada (μ CT): avaliação volumétrica e linear da perda óssea alveolar.

Para estas hemi-arcadas, imediatamente após o sacrifício dos animais, as peças tiveram o tecido gengival removido, congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C. O remanescente das peças foi fixado em paraformol 4% por 24h, e transferido posteriormente para frascos com álcool 70 para posterior análise por μ CT.

Avaliação Histológica Estereométrica

A análise estereométrica do processo inflamatório foi realizada com o auxílio de um microscópio de luz *Leica* DMLS na magnificação de 200x. Um total de 3 cortes foram avaliados por peça. As áreas de interesse dos cortes pré-selecionados foram fotografadas com uma câmera digital *Leica* (Leica DFC300FX, Leica Microsystem Ltd, Switzerland) e as imagens capturadas arquivadas no formato TIFF (*Tagged Image File Format*).

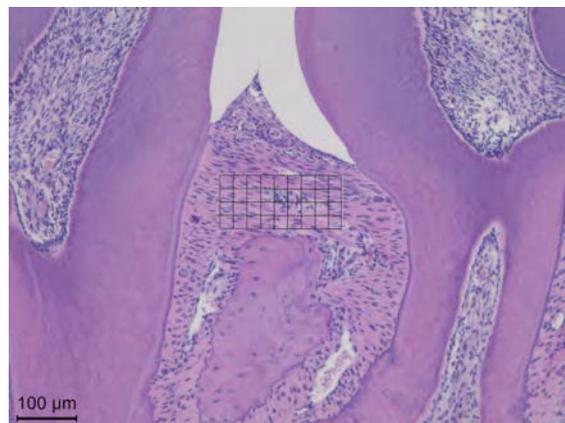
A técnica estereométrica de contagem de pontos foi empregada nos cortes corados com H/E para avaliação da proporção de componentes teciduais coincidentes com os pontos de intersecção das retas de uma grade de 17765 μm^2 de área e 50 pontos de intersecção, em um plano bidimensional. Este procedimento permite a avaliação quantitativa do quadro inflamatório nas proximidades da agressão.

Com esta finalidade, foi determinada a densidade volumétrica relativa (ou proporção) dos seguintes componentes teciduais: fibras colágenas, fibroblastos, células inflamatórias e vasos sanguíneos. A grade foi inserida nas imagens obtidas dos cortes histológicos utilizando-se o software *Adobe Photoshop CS6*, na região de tecido conjuntivo supra-alveolar junto à crista óssea intrerproximal entre o primeiro e segundo molares superiores (Figura 4).

Os limites coronal e medial foram representados, respectivamente, pela base do tecido epitelial e a estrutura dental, mantendo-se o padrão de área analisada para todas as imagens.

Em seguida, realizou-se uma análise percentual de cada componente tecidual em relação ao número total de pontos contados por períodos experimentais baseados nos trabalhos de Liu et al.⁴² (2006) e de Odze et al.⁵⁰ (1996), para representação gráfica da estereometria. Todas as análises foram realizadas 3x por um examinador cego para os grupos experimentais.

Figura 4 - Imagem histológica representativa da metodologia utilizada para a análise estereométrica de contagem de componentes teciduais. Observar posicionamento supra-ósseo da grade na região interproximal do primeiro e segundo molares. H/E. Aumento 100x.



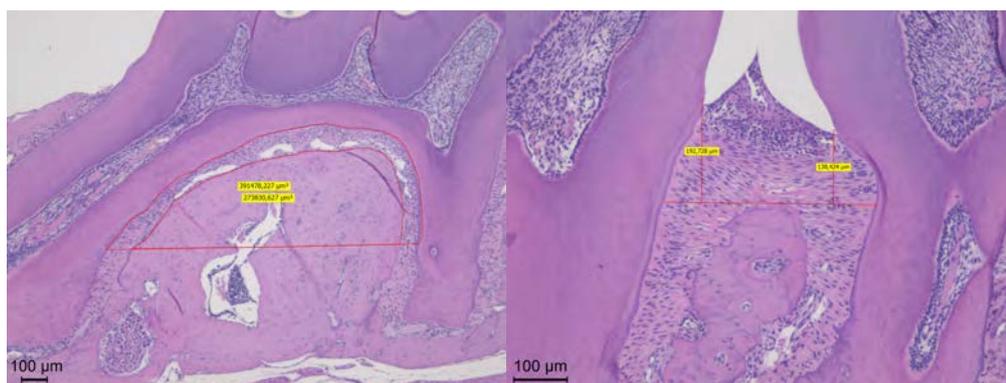
Avaliação Histométrica da Perda Óssea Alveolar

As imagens obtidas dos cortes corados com H/E foram utilizadas também para análise histométrica – medida da extensão linear e de área da perda óssea na face interproximal (mesio-distal) entre o primeiro e segundo molar e medida da área de

perda óssea alveolar na região de furca do primeiro molar. Estas análises foram realizadas por um examinador cego e calibrado.

A análise histométrica foi feita por meio do software de imagem *Image J* versão 1.37b. (*National Institutes of Health, USA*, <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs>). A medida da distância da crista óssea alveolar à junção cimento-esmalte foi obtida, na área interproximal entre o primeiro e segundo molares superiores (Figura 5). Já na região de furca, a área delimitada foi feita de acordo com a metodologia de Duarte et al.¹¹ (2006). A região delimitada foi de 500 µm abaixo do teto da furca no espaço inter-radicular dos primeiros molares superiores. A área total da região inter-radicular e a área com tecido ósseo presente foram medidas (Figura 5), e por meio da subtração destes valores obteve-se a quantidade de tecido ósseo reabsorvido. Foi feita uma porcentagem dos valores obtidos para se ter a proporção de perda óssea.

Figura 5 - Cortes Histológicos demonstrando a metodologia utilizada para a análise histométrica da extensão da área óssea na região da furca do primeiro molar (500 µm sentido apical) e linear do nível ósseo interproximal.



Imunohistoquímica

Para a imunohistoquímica, foram utilizados cortes com 4 µm de espessura, montados 3 cortes por lâminas silanizadas (DAKO, Glostrup, Dinamarca).

Inicialmente os cortes histológicos foram desparafinizados em baterias sucessivas de xilol e soluções alcoólicas decrescentes e posterior lavagem com água destilada.

Para a detecção de osteoclastos, foi marcada a proteína TRAP com o anticorpo anti-TRAP (sc-30833; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Para a análise por imunohistoquímica, foi utilizado o método do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) com a utilização do kit de imunohistoquímica (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) segundo as instruções do fabricante. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com a incubação por meio da aplicação de peróxido de hidrogênio a 3% e o bloqueio das ligações inespecíficas foram realizadas com 3% de BSA (*Bovine serum albumin*; BSA, Sigma, USA). A incubação com o anticorpo primário (1:100, sc 30833, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) para a proteína em análise foi feita *overnight* em câmara úmida à temperatura ambiente, após otimização da diluição. Após repetidas lavagens das peças em PBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado e pronto para uso (LSAB, DAKO, Glostrup, Dinamarca) por 30 minutos, seguido de incubação por 30 minutos com o complexo Streptavidina-Biotina-Peroxidase (LSAB, DAKO, Glostrup, Dinamarca), em câmara úmida, à temperatura ambiente. Os cortes foram novamente lavados por repetidas trocas de PBS, revelados com solução de diaminobenzidina/peróxido de hidrogênio (DAB, DAKO, Glostrup, Dinamarca) e contra-corados com Hematoxilina de Carrazi por 45 segundos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas e montadas em Permount.

A intensidade, contagem e localização da coloração foram registradas por um examinador cego para os grupos experimentais em microscopia óptica, analisando a região interproximal entre os primeiros e segundos molares dos animais estudados. As reações de imunohistoquímica foram acompanhadas de um controle negativo,

omitindo a etapa de incubação com o anticorpo primário e substituindo por solução de PBS/BSA 1%.

Extração de DNA Total e PCR em Tempo Real

Para a confirmação da colonização bucal pelo periodontopatógeno inoculado, *Porphyromonas gingivalis*, amostras de tecidos gengivais de todos os animais foram coletadas no momento do sacrifício e armazenadas conforme previamente descrito para posterior análise por PCR em Tempo Real. Os experimentos foram iniciados a partir da extração do DNA, que foi feito seguindo o protocolo para extração de Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA).

Para a obtenção da curva padrão de *Porphyromonas gingivalis*, foram construídos plasmídeos recombinantes albergando uma única cópia do gene *16SrRNA* de amostras de referência *Porphyromonas gingivalis*. Estes foram preparados no Laboratório de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da USP, São Paulo-SP, sob a supervisão da Profa. Dra. Marcia Mayer. Para montagem da curva padrão, diluições seriadas foram feitas a partir da concentração dos plasmídeos contendo os insertos *16SrRNA* de *Porphyromonas gingivalis* após sua quantificação em espectrofotômetro (GeneQuant, absorvância= 260 nm). Para sua quantificação absoluta, foi feita em cada placa uma curva padrão com 6 concentrações conhecidas do DNA de *Porphyromonas gingivalis* (1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6) e um controle negativo (água em lugar de DNA).

Dois microlitros do produto da reação de DNA foram utilizados num volume total de reação de PCR de 22 μ L. Este volume incluiu, além do produto da reação de qPCR, 7,9 μ L água livre de nucleases, 11 μ L Syber Green (*Applied Biosystems*) e 0,55 μ L de cada Primer em uma concentração de 0,1 μ M na reação.

As condições pré-otimizadas de ciclagem utilizadas foram: 50⁰C por 2 minutos, 95⁰C por 10 minutos e 40 ciclos de 95⁰C por 15 segundos e 60⁰C por 1 minuto. O PCR em tempo real foi realizado em um equipamento Step One Plus (*Applied Biosystems*).

Microtomografia computadorizada – μ CT

Após o sacrifício dos animais, as hemimaxilas do lado direito foram removidas (N = 6 para cada grupo, de cada período experimental), fixadas em paraformol a 4% durante 24 horas e depois transferidas para uma solução de álcool 70% e armazenadas em temperatura ambiente. Os espécimes foram escaneados utilizando um sistema de microtomografia computadorizada (Skyscan 1176, Aartselaar, Bélgica).

Método de escaneamento: Os parâmetros utilizados da tomografia computadorizada foram os seguintes: o tamanho da imagem em pixel foi de 2000 x 1336 (18 μ m); a espessura dos cortes de 12 μ m; a magnificação da imagem de 10x; a voltagem do tubo de raios-X foi de 50 kV e o feixe de 496 uA e a corrente elétrica ajustada para 0.1mA. As imagens tridimensionais foram reconstruídas utilizando um software de reconstrução (NRecon 1.6.1.5 – SkyScan, Belgium). Os parâmetros para reconstrução foram: Beam Hardening Correction 4%, Ring Artifact Correction =3, Smoothing =1, Postalignment =1.00. (de Molon et al.⁴⁷, 2014)

Análise linear (2D): Para a realização da análise linear foi utilizado um software bidimensional (Data Viewer 1.4.3.1 - SkyScan, Bélgica) para possibilitar a visualização e a quantificação da perda óssea alveolar. Todos os cortes escaneados foram reorientados em três planos, frontal, coronal e transaxial, antes de cada análise

para padronização da posição anatômica. A medida da perda óssea alveolar foi determinada (em mm) a partir da junção cimento-esmalte (JCE) até a crista óssea alveolar (COA) na região distal da raiz disto-vestibular e região mesial da raiz mesio-vestibular do primeiro molar, na região mesial e distal da raiz vestibular do segundo molar, e também nas regiões mesial e distal do terceiro molar. As imagens nos cortes frontais foram reorientadas para que tanto a JCE como o ápice da raiz aparecesse no mesmo corte tomográfico padronizando assim, todas as imagens. (de Molon et al.⁴⁷, 2014)

Análise Volumétrica (3D): As mensurações volumétricas foram feitas utilizando um software específico (CT Analyser 1.10.1.0 - SkyScan, Belgium), seguindo a seleção de uma área de interesse (ROI – *region of interest*) tridimensional. O examinador foi guiado pelas marcações morfométricas durante o desenho do ROI.

Para maximizar a quantificação do osso, minimizar a inclusão de dentes e raízes e usar o mínimo de marcações possíveis, o ROI foi delimitado no sentido mesio-distal a partir da raiz distal do segundo molar até a raiz mesial do primeiro molar, e no sentido cervico-apical englobando todo o teto da furca do primeiro molar até 500 µm apical a esta estrutura anatômica. Assim, toda a área óssea da região interproximal e região de furca do primeiro molar foram envolvidas no ROI. Utilizando uma ferramenta avançada para o desenho do ROI, o contorno 2D foi desenhado em intervalos regulares (a cada 12 planos) para minimizar o efeito da variabilidade do contorno da raiz. Depois, um ROI 3D foi criado utilizando um software (CT Analyser 1.10.1.0 - SkyScan, Belgium) baseado na resultante do contorno 2D. A partir daí, os parâmetros de fração do volume ósseo foram determinados. As análises foram realizadas por um examinador cego e calibrado (de Molon et al.⁴⁷, 2014).

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Foram avaliados comparativamente os resultados obtidos para os diferentes grupos, para todos os parâmetros analisados, em cada período. Para análise da perda óssea (histometria e μ CT) e análise quantitativa dos componentes teciduais por estereometria, a análise estatística foi realizada utilizando-se o teste de análise de variância one-way Anova seguido de comparação entre os grupos com o teste de Tukey. Para a análise quantitativa da presença de *Pg* nas amostras de tecido gengival por qPCR, empregou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunn para comparação inter-grupos e o teste de Wilcoxon para comparação intra-grupo. Considerou-se nível de 5% de significância como regra de decisão por uma diferença significativa.

5 RESULTADO

Análise Histológica- Estereométrica

Com as amostras obtidas dos cortes histológicos de 6 animais/grupo (Figuras 6 e 7), dos períodos de 45 e 60 dias, de todos os grupos, foram feitas as análises para quantificação de fibroblastos, células inflamatórias, matriz extracelular e número de vasos presentes na região supra-óssea interproximal (entre primeiro e segundo molares). Os resultados foram submetidos ao teste paramétrico *One-way* ANOVA complementado pelo teste de Tukey para avaliar a diferença entre os grupos. (Figuras 8 e 9)

- Grupo C – Controle

Nos cortes histológicos dos molares superiores direito dos camundongos do grupo controle, do período de 45 dias, não observou-se na região supra-óssea interproximal, infiltrado inflamatório significativo. Houve um predomínio de fibroblastos e matriz extracelular na região do tecido conjuntivo com poucos vasos sanguíneos. No período de 60 dias verificou-se normalidade no tecido conjuntivo acima da crista óssea.

- Grupo L – Ligadura

Os cortes histológicos dos camundongos submetidos à indução da doença periodontal por ligadura apresentaram evidente reação inflamatória representada por uma quantidade significativa de células inflamatórias e aumento de vasos em relação ao grupo controle, tanto no período de 45 quanto 60 dias. A menor quantidade de fibroblastos no tecido conjuntivo supra-ósseo em relação aos outros grupos, principalmente observado no período de 45 dias, também é uma característica significativa que evidencia a presença da doença periodontal ativa na região estudada.

- Grupo G-*Pg* – Gavagem de *Porphyromonas gingivalis*

Os animais submetidos à indução de doença periodontal (DP) por meio de gavagem por *Pg* não demonstraram, em cortes histológicos, um grau elevado e significativo de reação inflamatória, observado pela menor quantidade de células inflamatórias e vasos sanguíneos na região estudada. Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa também em relação às outras estruturas analisadas em comparação com todos os demais grupos, em ambos os períodos analisados.

- Grupo G-*PgFn* – Gavagem de *Porphyromonas gingivalis* + *Fusobacterium nucleatum*

Assim como o grupo G-*Pg*, o grupo dos animais submetidos à indução de DP por gavagem de *Pg* e *Fn* também não demonstrou, histologicamente, variação significativa na quantidade de estruturas analisadas quando comparado ao demais grupos, tanto no período 45 dias quanto no período de 60 dias.

Figura 6 – Fotomicrografias das áreas de furca dos primeiros molares (coluna da esquerda) e das regiões interproximais entre os primeiros e segundos molares (coluna da direita) dos animais do grupo controle (C), grupo Ligadura (L), grupo gavagem com *Porphyromonas gingivalis* (G-Pg) e grupo gavagem com *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* (G-PgFn) no período de 45 dias. H/E. Aumento 50x.

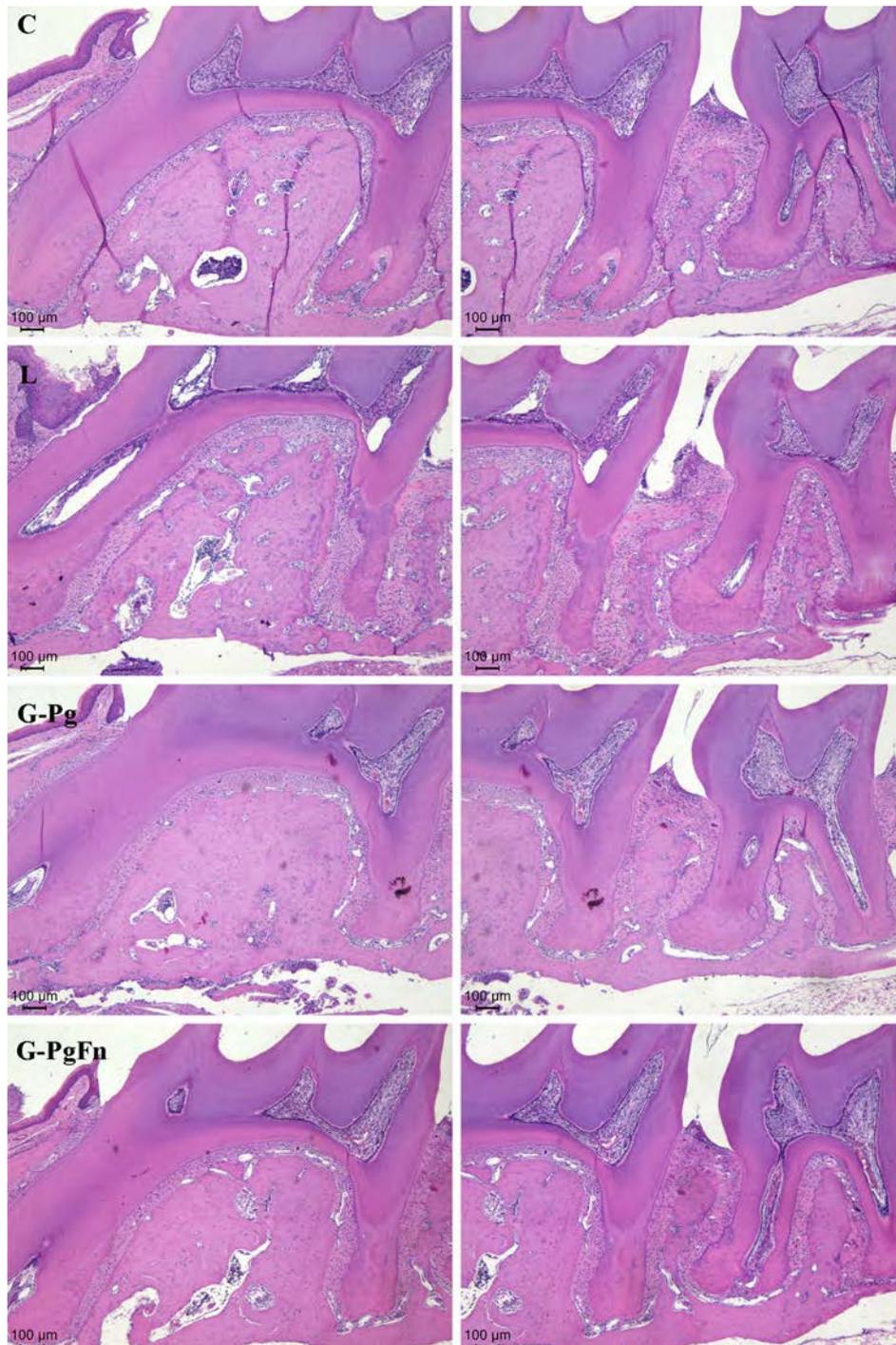


Figura 7 – Fotomicrografias das áreas de furca dos primeiros molares (coluna da esquerda) e das regiões interproximais entre os primeiros e segundos molares (coluna da direita) dos animais do grupo controle (C), grupo Ligadura (L), grupo gavagem com *Porphyromonas gingivalis* (G-Pg) e grupo gavagem com *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* (G-PgFn) no período de 60 dias. H/E. Aumento 50x.

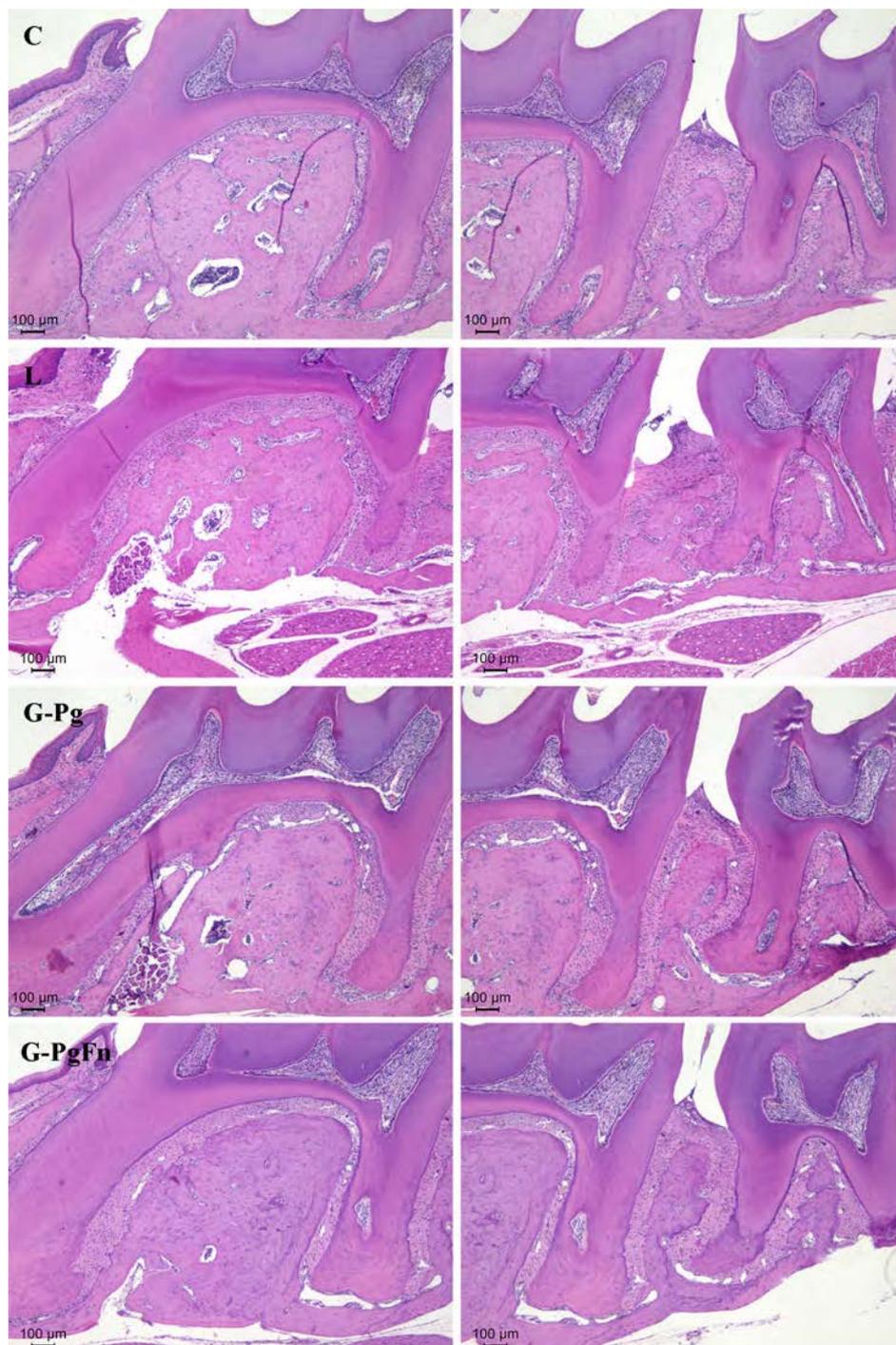


Figura 8 – Gráficos da quantificação das estruturas teciduais analisadas na estereometria na região supra-cristal, no período de 45 dias. (*) Indica diferença significativa do grupo L em relação a todos os demais grupos. ANOVA ($p < 0.05$).

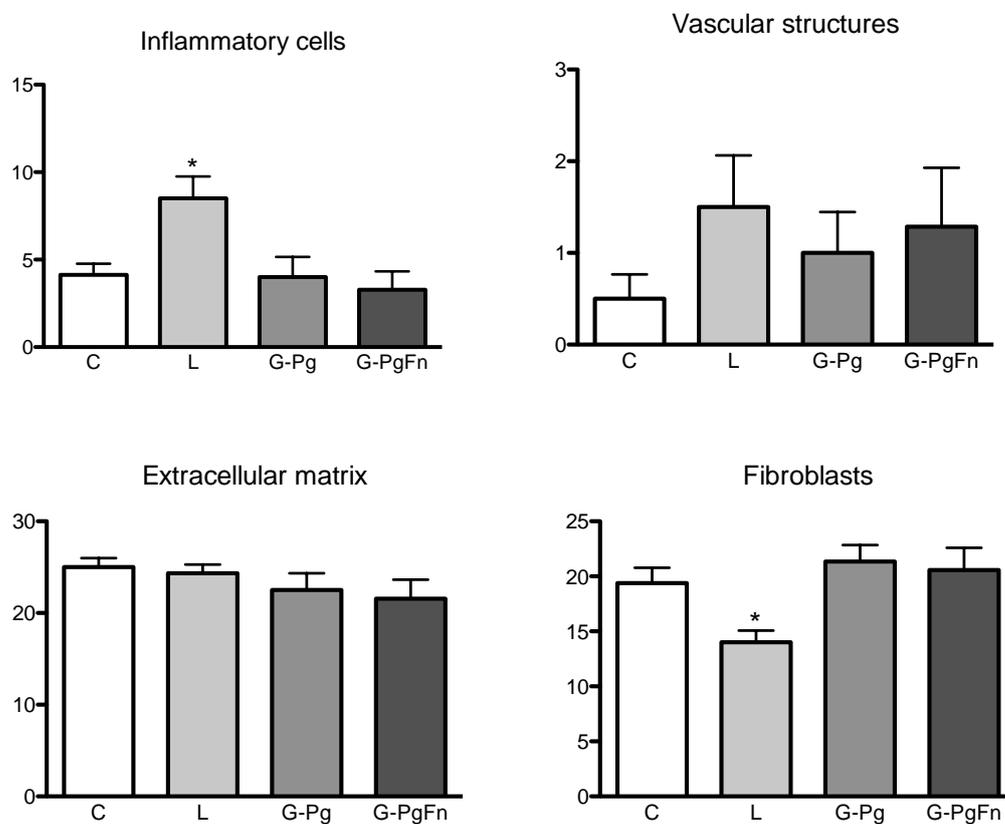
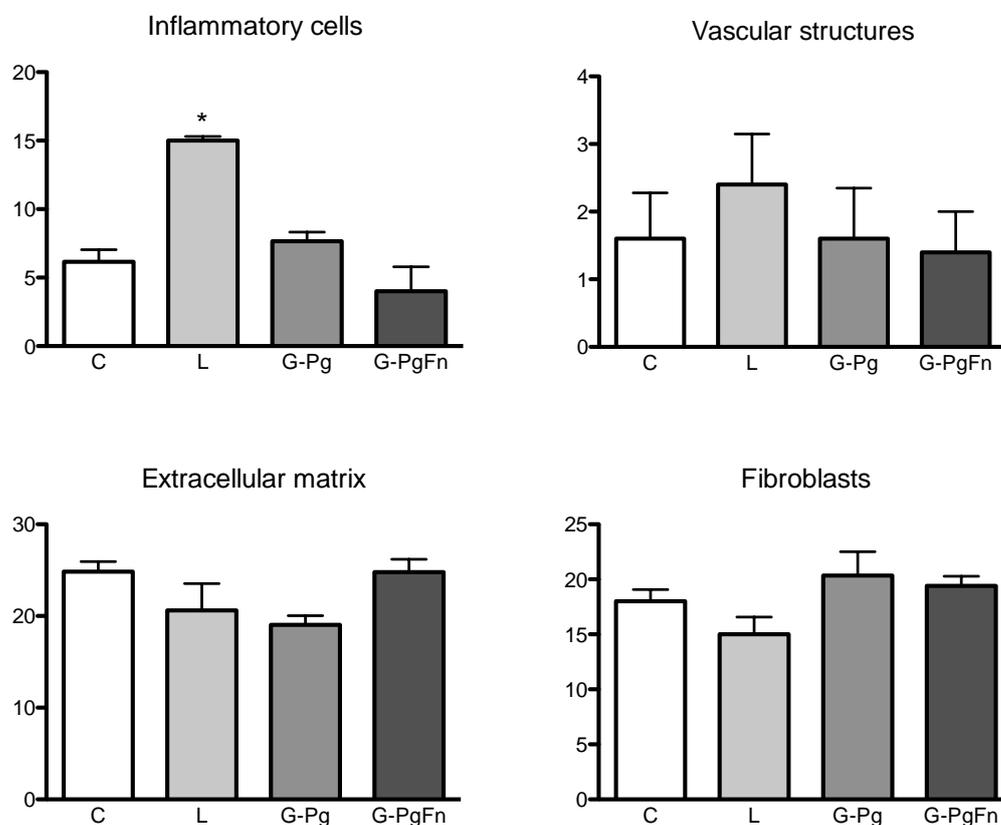


Figura 9 – Gráfico da quantificação das estruturas teciduais analisadas na estereometria na região supra-cristal, no período de 60 dias. (*) Indica diferença significativa do grupo L em relação a todos os demais grupos. ANOVA, ($p < 0,05$).



Análise Histométrica

A análise histométrica foi realizada através de medida linear da distância da junção cimento-esmalte até o nível da crista óssea alveolar proximal (primeiro e segundo molares) e da medida de área óssea da região de furca do primeiro molar. Observou-se que, nos períodos de 45 e 60 dias, apenas o grupo L mostrou resultado estatisticamente diferente em relação a todos os demais grupos apresentando maior perda óssea, demonstrada pela maior e significativa distância da JCE ao nível da crista óssea proximal e menor área óssea de furca (Figuras 10 e 11).

Figura 10 - Medida de área óssea de furca do primeiro molar e distância linear (JCE-Crista óssea) da região entre o primeiro e segundo molares no período de 45 dias. (*) Indica diferença significativa do grupo L em relação a todos os demais grupos. ANOVA, ($p < 0,05$).

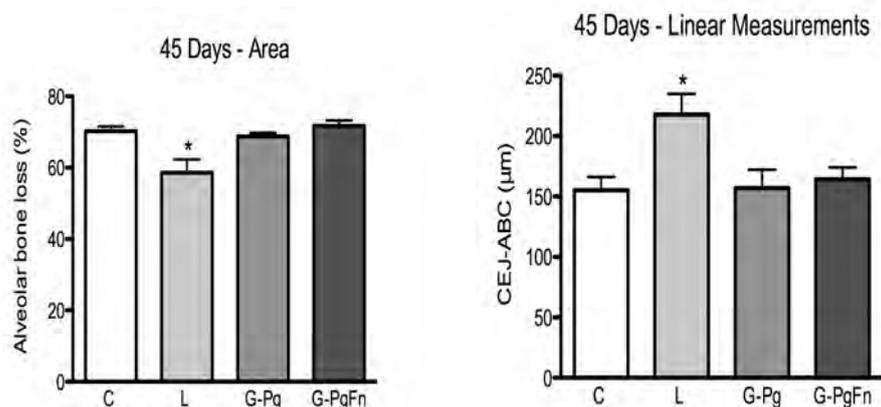
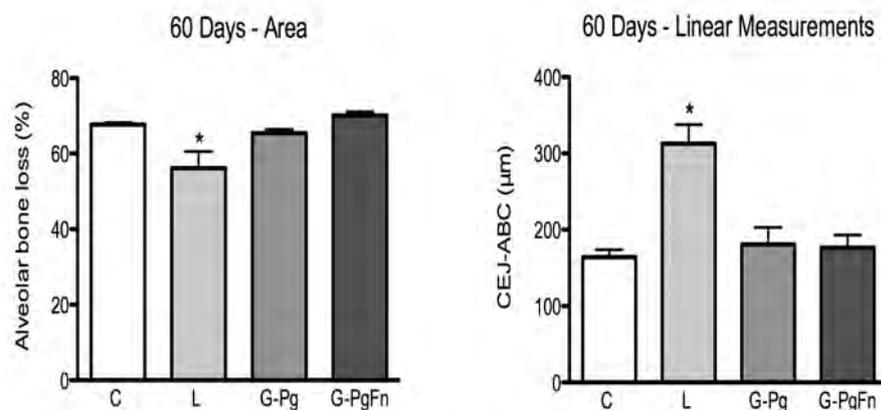


Figura 11 - Medida de área óssea de furca do primeiro molar e distância linear (JCE-Crista óssea) da região entre o primeiro e segundo molares no período de 60 dias. (*) Indica diferença significativa do grupo L em relação a todos os demais grupos. ANOVA, ($p < 0,05$).



PCR em Tempo Real

Com as amostras de tecido gengival obtidas dos animais de cada grupo do período de 45 e 60 dias, foi feita a quantificação de DNA e analisada quanto a presença de *Pg*, buscando-se confirmar ou não a colonização bacteriana dos animais. Observou-se uma quantidade significativamente maior do gene de *Pg* nos grupos G-L e G-*Pg* quando comparados ao grupo controle dos respectivos períodos, não constatando-se o mesmo no grupo G-*PgFn* (Figura 12). Não houve diferença estatisticamente significativa intragrupos nos dois períodos estudados (Figura 13).

Figura 12 – Quantificação do gene 16srRNA de *Pg* nas amostras de tecido gengival dos animais, nos diferentes grupos experimentais, nos períodos de 45 e 60 dias; (*= $p < 0,05$, Kruskal-Wallis test) *Indica diferença estatisticamente significante em relação ao grupo C.

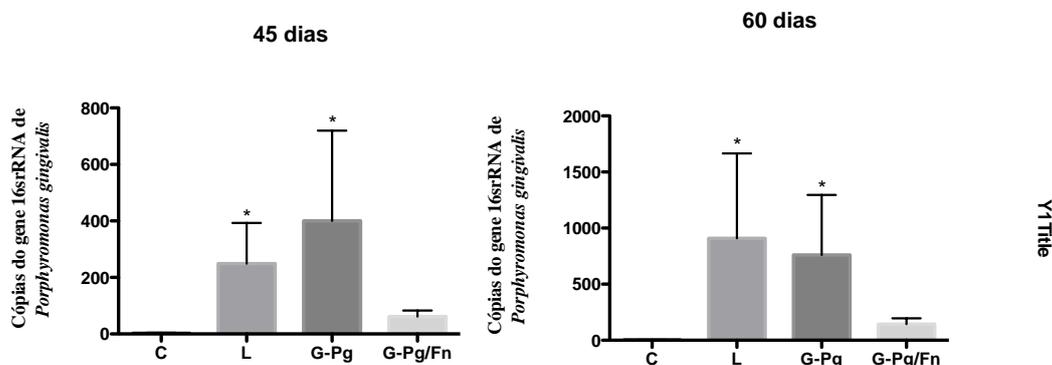
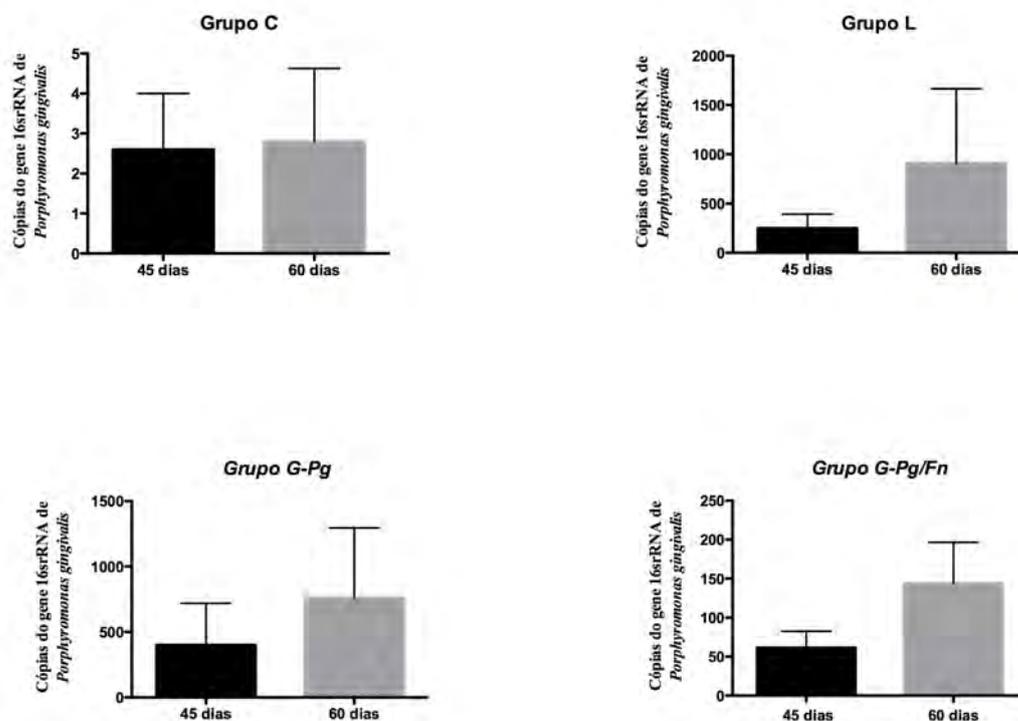


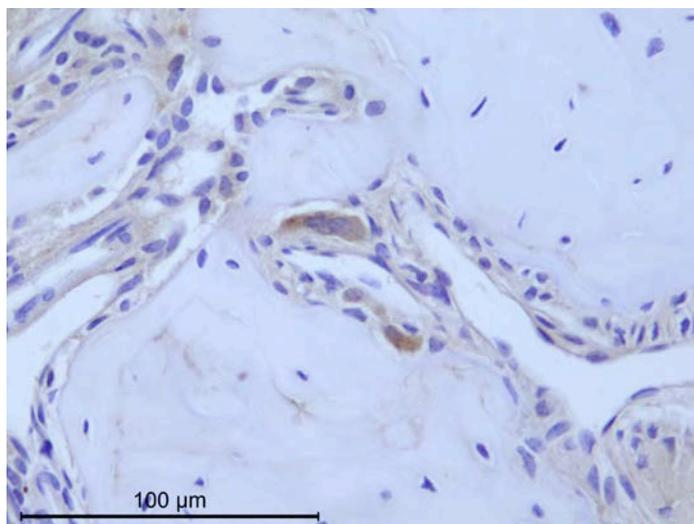
Figura 13 – Comparação intragrupo da quantificação do gene 16srRNA de Pg nas amostras de tecido gengival dos animais, nos diferentes grupos experimentais, nos períodos de 45 e 60 dias; ($p < 0,05$, Wilcoxon teste)



Análise Imunohistoquímica

A análise da presença de osteoclastos pelo método de imunohistoquímica de TRAP revelou apenas a presença de células isoladas na região de interesse de algumas amostras analisadas, não permitindo uma análise estatística (Figura 14).

Figura 14 - Imagem ilustrativa de teste imunohistoquímico para detecção de TRAP, confirmando a efetividade da técnica.



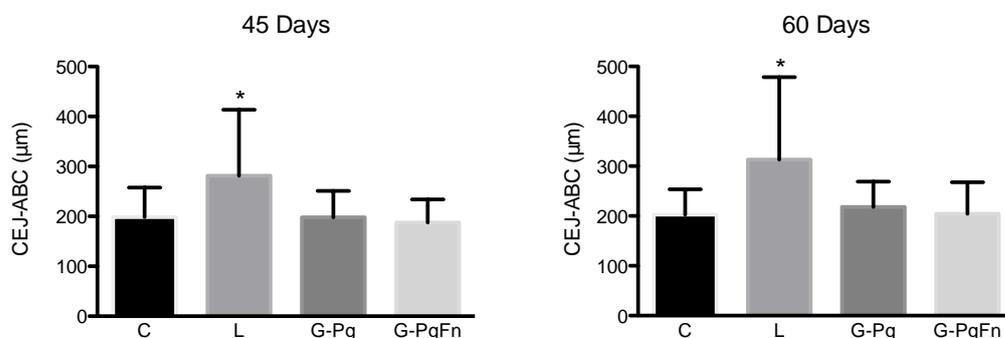
Microtomografia Computadorizada – μ CT

Imagens tridimensionais geradas a partir dos cortes tomográficos revelaram uma redução do osso alveolar no grupo L (ligadura) na área interproximal entre o primeiro e o segundo molar nos períodos de 45 e 60 dias (ex-vivo), comparados com os demais grupos.

Análise Linear

A análise linear mostrou que no grupo L houve um aumento na perda óssea alveolar em altura (distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar proximal) quando comparado aos demais grupos, tanto no período de 45 dias quanto no de 60 dias, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os outros grupos ($p < 0,05$) (Figura 15).

Figura 15 – Medida linear do defeito ósseo nos diferentes grupos experimentais do período de 45 e 60 dias (μ CT). (*) Indica diferença estatisticamente significativa em relação a todos os demais grupos. ANOVA, ($p < 0.05$)



Análise Tridimensional Volumétrica

Os resultados da análise volumétrica (Figuras 17 e 18) demonstraram que, em todos os períodos estudados, a instalação da ligadura resultou em redução estatisticamente significativa do volume ósseo presente na região de interesse (ROI), comparado com os demais grupos ($p < 0.05$).

Figura 16 – Percentual de volume ósseo alveolar na região de interesse, analisado por microtomografia computadorizada, nos períodos indicados.* Indica diferença estatisticamente significativa em relação a todos os demais grupos. ANOVA, ($p < 0.05$)

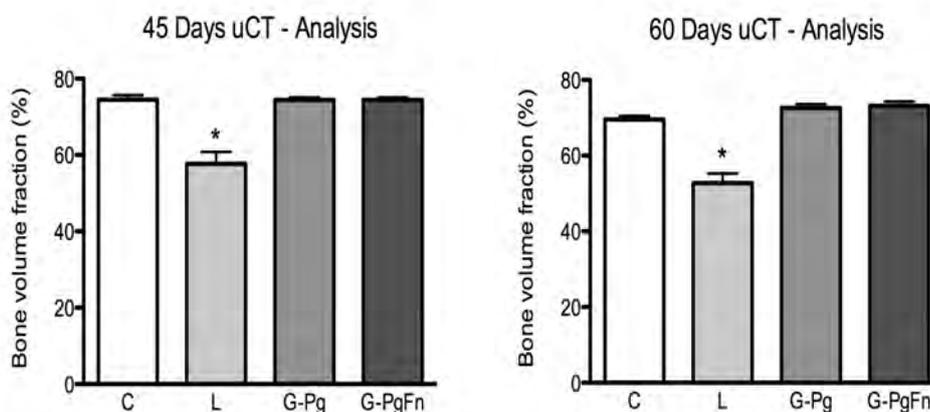


Figura 17 – Fotomicrografia bidimensional histológica (coluna da esquerda), microtomográfica (coluna central) e reconstrução tridimensional volumétrica (coluna da direita) dos três molares superiores, em todos os grupos, no período de 45 dias. É possível notar evidente perda óssea na região interproximal entre o primeiro e o segundo molar do grupo L.

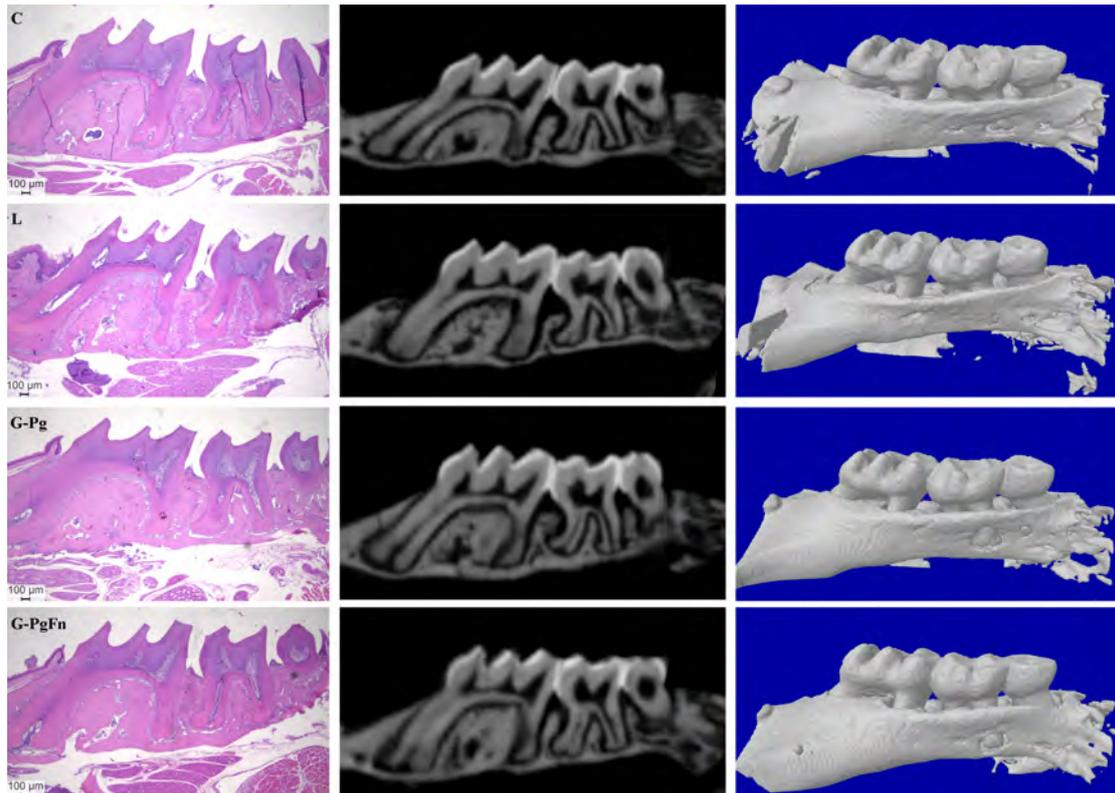
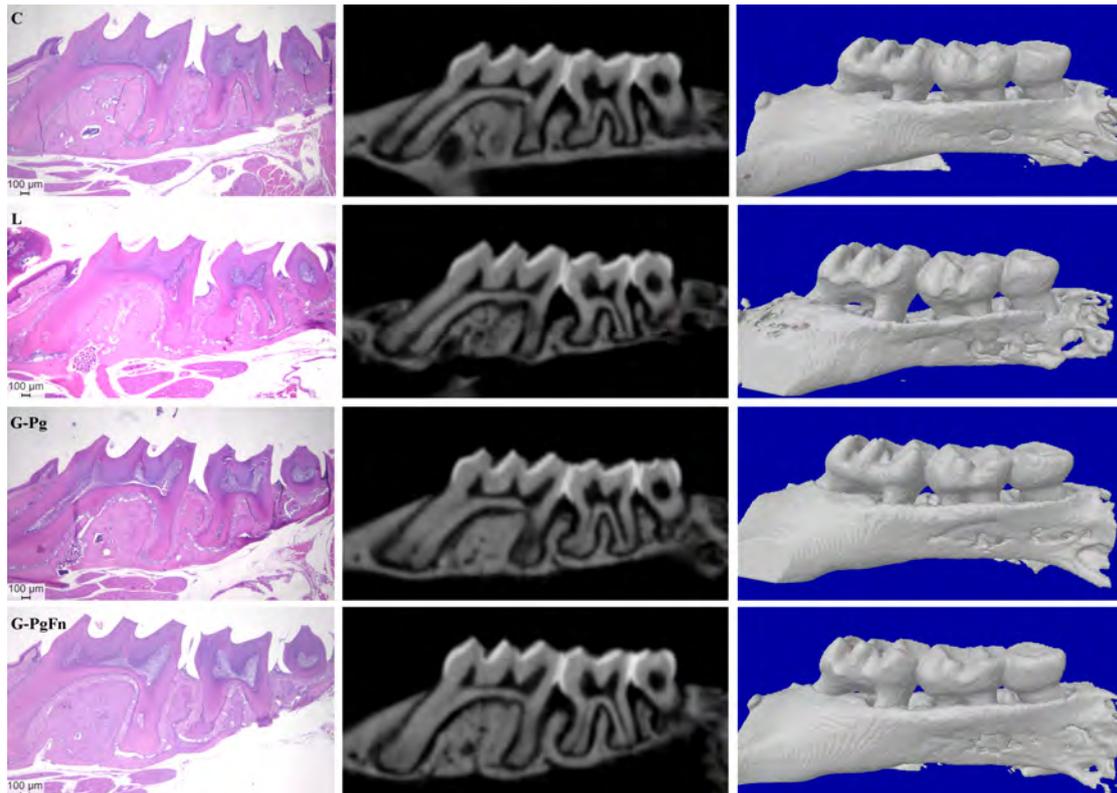


Figura 18 – Fotomicrografia bidimensionalhistológica (coluna da esquerda), microtomográfica (coluna central) e reconstrução tridimensional volumétrica (coluna da direita) dos três molares superiores em todos os grupos no período de 60 dias. É possível notar evidente perda óssea na região interproximal entre o primeiro e o segundo molar do grupo L.



6 DISCUSSÃO

A periodontite é uma doença infecciosa de caráter crônico inflamatório que promove a destruição dos tecidos periodontais. É, causada por diversos fatores, destacando-se a presença e ação de alguns tipos de bactérias do biofilme dental e seus produtos, levando a alterações patológicas no equilíbrio do metabolismo ósseo e, conseqüentemente, à progressão da doença periodontal (Madeira et al.⁴⁴, 2013; Sloan et al.⁶¹, 2013). O estudo da doença periodontal em humanos tem sido beneficiado com o uso de modelos animais em pesquisas, buscando facilitar o entendimento dos mecanismos que envolvem a relação hospedeiro-patógeno no estabelecimento e progressão da doença (Hardham et al.²⁵, 2005). Vários modelos de animais têm sido propostos para reproduzir a doença periodontal em humanos, buscando entender a complexa interação entre comunidades de microorganismos e seu hospedeiro além de uma melhoria no potencial dos componentes terapêuticos (Darveu et al.¹⁰, 2012). Entre esses modelos destacam-se: gavagem oral por meio de inoculação de cepas de bactérias vivas na cavidade oral e colocação de ligadura na cervical dos dentes dos animais.

O método de indução por meio de ligadura, descrito inicialmente em 1966 (Rovin et al.⁵⁶, 1966), é um dos modelos mais usados atualmente na pesquisa periodontal, favorecendo o início da doença periodontal e levando a uma sequência de eventos que irão culminar na reabsorção óssea de forma rápida, em ratos e camundongos. O procedimento facilita o acúmulo de bactérias na região, aumentando a resposta inflamatória aos produtos bacterianos e, conseqüentemente, a reabsorção óssea (Abe et al.¹, 2013). Graves et al.²² (2012) afirmaram que a utilização de ligadura para induzir a doença periodontal em ratos já ocorre no período de 7 dias após sua

instalação. Hoffman, Schour²⁷ (1940) afirmaram que a erupção contínua dos dentes associada à aposição de cimento radicular aumenta em 0,8 mm a distancia da junção cimento-esmalte à crista-óssea, sendo assim uma reabsorção fisiológica. No entanto, Kuhr et al.³⁷ (2004), observaram que após 60 dias de ligadura nos animais, medidas lineares de reabsorção óssea foram significativamente maiores em relação aos animais que não receberam as ligaduras, constatando-se não somente uma alteração fisiológica, mas também patológica. Embora observados em ratos, esses achados corroboram com os dados deste trabalho, onde observou-se significativa reabsorção óssea nos grupos com ligadura de 45 e 60 dias tanto nas análises histométricas (Figuras 10 e 11) quanto por μ CT (Figura 16), quando comparadas ao grupo controle.

Assim como em nosso estudo, outros trabalhos (Abe et al.¹, 2013; Meulman et al.⁴⁵, 2011; de Molon et al.⁴⁷, 2014) também observaram reabsorção óssea significante quando utilizado o método de ligadura em ratos ou camundongos, confirmando ser um método eficaz na indução da doença periodontal. Molon et al.⁴⁷ (2014), avaliaram 4 diferentes tipos de métodos de indução de doença periodontal em camundongos C57BL/6 wild type e observou que o grupo que foi submetido à ligadura apresentou uma acentuada destruição óssea principalmente na área interproximal entre o primeiro e o segundo molares além de um elevado e significativo escore de tecidual inflamatório na região analisada. Esses dados estão em acordo com nossos resultados onde observamos maior número de células inflamatórias nos grupos submetidos à ligadura, comprovados pela análise estereométrica (Figuras 8 e 9). Por outro lado, embora em nosso trabalho tenha sido utilizado períodos maiores (45 e 60 dias), a perda óssea ocorreu de forma similar ao trabalho realizado por Molon et al.⁴⁷ (2014) que avaliaram a perda óssea em menores períodos de tempo (7, 15 e 30 dias)

evidenciando a característica crônica da doença após os períodos iniciais de doença aguda (7-15 dias).

Entre as desvantagens do método de ligadura, tem sido (Graves et al.²¹, 2008; Kuhr et al.³⁷, 2004) destacado o trauma mecânico causado pelo fio instalado no molar e a redução da resposta inflamatória em períodos mais longos. Em animais de grande porte a ligadura pode não representar um trauma aos tecidos e em alguns casos não são capazes de provocar grande inflamação; porém, em pequenos animais como camundongos, não se pode excluir a possibilidade de trauma mecânico (Abe et al.¹, 2013; Graves et al.²¹, 2008). No entanto, em nosso estudo, as ligaduras foram instaladas cuidadosamente evitando-se grandes traumas. Além disso, os resultados obtidos por nosso grupo também devem-se ao fato do modelo de periodontite induzido por ligadura estar diretamente associado ao acúmulo de microorganismos bacterianos ao redor da ligadura, que são os principais causadores da resposta inflamatória com evidente migração apical do epitélio juncional, inflamação e reabsorção óssea (Figuras 6 e 7) (Kenworthy, Baverel³⁰, 1981; Kimura et al.³³, 2000; Rovin et al.⁵⁶, 1966; Sallay⁵⁹, 1982).

O modelo de periodontite experimental induzido por gavagem oral de bactérias tem sido usado por vários estudos (Mkonyi et al.⁴⁶, 2012; Polak et al.⁵³, 2012; Polak et al.⁵⁴, 2009; Yuan et al.⁷¹, 2013) apresentando grande impacto no periodonto de diferentes linhagens e espécies de animais. Diversas bactérias periodontopatogênicas têm sido utilizadas nesses modelos, destacando-se dentre elas a *Porphyromonas gingivalis*, bactéria anaeróbia, gram-negativa, classificada como membro do “Complexo Vermelho”, que indica uma forte associação com a doença periodontal. (Darveu et al.¹⁰, 2012; Socransky et al.⁶³, 1998) Utilizando o modelo de gavagem oral com *Pg*, alguns estudos (de Molon et al.⁴⁷, 2014; Saadi-Thiers et al.⁵⁷,

2012) não tiveram êxito em induzir perda óssea alveolar, no entanto, esses estudos utilizaram menores períodos de avaliação de gavagem, variando de 7 a 30 dias. Assim, nosso estudo buscou avaliar esse modelo de indução de DP em maiores períodos de tempo, visto o caráter crônico da doença.

No entanto, embora outros estudos (Baker et al.³, 2000; Wilensky et al.⁶⁸, 2005) tenham observado reabsorção óssea alveolar em ratos submetidos à gavagem oral com *Pg*, em nosso modelo de estudo não observamos reabsorção óssea alveolar estatisticamente significativa nos períodos estudados (Figuras 10, 11 e 16), assim como não houve evidência da presença da doença nos dados esteriométricos apresentados (Figuras 8 e 9). Porém, vale ressaltar que a colonização bacteriana no grupo G-*Pg* foi confirmada por PCR-RT, que detectou a presença da bactéria no tecido gengival de todos os animais do grupo *Pg*, mesmo no período mais tardio, em proporções estatisticamente superiores ao grupo C (Figura 12). Esses dados podem ser explicados pelo diferente potencial de indução da doença apresentado por diferentes cepas de *P. gingivalis*. Baker et al.³ (2000), buscaram analisar a heterogeneidade de cepas de *Porphyromonas gingivalis* na indução da reabsorção alveolar em camundongos e observaram que entre as cepas analisadas, a *Pg* ATCC 33277 (mesma cepa utilizada em nosso estudo) não induziu perda óssea, indicando que diferenças genéticas das bactérias podem influenciar diretamente no potencial de virulência bacteriano e na resposta do hospedeiro. Por outro lado, assim como outros estudos (Kesavalu et al.³¹, 2007; Polak et al.⁵³, 2012; Polak et al.⁵⁴, 2009; Wilensky et al.⁶⁸, 2005), um estudo conduzido por Wilensky et al.⁶⁹ (2009) demonstraram uma significativa destruição periodontal utilizando 3 diferentes tipos de cepas de *P. gingivalis*, detectando perda óssea alveolar em todos os grupos analisados, incluindo o

grupo que foi submetido à gavagem com *Pg* ATCC 33277, mesma cepa bacteriana utilizada em neste estudo.

Alguns estudos (Kesavalu et al.³¹, 2007; Polak et al.⁵⁴, 2009) têm mostrado que infecções com co-agregação de diferentes patógenos são capazes de modular a resposta inflamatória afetando clinicamente o hospedeiro. A *Fusobacterium nucleatum* é uma bactéria presente no biofilme subgingival de pacientes com doença periodontal que participa da adesão e coagregação de outras bactérias como a *P. gingivalis* (Haffagee, Socrasky²⁴, 1994; Polak et al.⁵³, 2012; Polak et al.⁵⁴, 2009; Weiss et al.⁶⁶, 2000). Assim, interações microbianas podem apresentar um complexo de interações que potencializam os sintomas de diversas patologias e, entre as doenças polimicrobianas, está a doença periodontal.

Polak et al.⁵⁴ (2009) observaram uma perda óssea periodontal estatisticamente significativa em camundongos infectados oralmente com uma mistura de *Pg* e *Fn*, quando comparado ao grupo controle sem inoculação. Também demonstraram haver uma relação de sinergismo entre as bactérias, potencializando o efeito de perda óssea do hospedeiro, observada na comparação com os grupos com inoculação monobacteriana. Esses resultados são contrários aos resultados encontrados por nosso grupo de estudos (Figuras 8 a 11) que não observaram evidências estatisticamente significantes de doença periodontal nos grupos infectados com associação de *Pg* + *Fn*. No entanto, Kesavalu et al.³¹ (2006) analisaram a reabsorção óssea alveolar em animais induzidos com inoculação de *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* associados ou não a *Fusobacterium nucleatum*. O autor observou que não houve diferença estatisticamente significativa nos grupos associados à *Fn* comparado aos grupos sem associação, corroborando com os resultados encontrados por nosso estudo (Figura 16). Esses resultados podem ser explicados pela

heterogeneidade genética das cepas dos microorganismos e por uma possível maior resistência da linhagem de camundongos utilizadas (C57/BL6) em desenvolver a doença periodontal (Baker et al.⁴, 2000; Graves et al.²¹, 2008; Kesavalu et al.³¹, 2005).

A susceptibilidade genética de diferentes espécies à doença periodontal pode ser um forte componente que influencia no desenvolvimento e progressão da doença. Baker et al.⁴ (2000) avaliaram o desenvolvimento de doença periodontal em diferentes espécies de camundongos através de gavagem oral de *Pg* e observou que as linhagens de camundongos C57BL/6J falhou em mostrar perda óssea quando comparada aos grupos controle assim como as linhagens A/J, A/HeJ, 129/J e SJL/J também demonstraram ser mais resistentes à perda óssea por infecção com *Pg*, ao contrário das linhagens AKR/J, DBA/2J e BALB/cByJ que demonstraram ser mais susceptíveis à perda óssea por DP.

Ainda em relação ao grupo G-*Pg/Fn*, ao analisar por PCR-RT amostras do tecido gengival dos animais, não foram detectadas quantidades estatisticamente significantes de *Pg* no grupo em questão, o que também explica o fato desse grupo não apresentar reabsorção óssea evidente (Figuras 12 e 13).

Alguns autores (Kimura et al.³³, 2000; Meulman et al.⁴⁵, 2011) têm realizado inoculações de bactérias associadas à ligadura, a fim de manter a intensidade da resposta inflamatória mesmo em períodos maiores de tempo. Meulman et al.⁴⁵ (2011) realizaram um estudo em 40 animais (ratos wistar) associando ligadura e *Porphyromonas gingivalis*, constatando que os animais submetidos à ligadura + *Pg* apresentaram maior reabsorção óssea (estatisticamente) em todos os períodos estudados (15, 21 e 30 dias) quando comparados ao grupo controle e ao grupo apenas com ligadura. Já na comparação intragrupo, os autores constataram que no grupo que foi submetido somente à ligadura houve maior reabsorção óssea (estatisticamente

significante) no período mais longo, de 30 dias; já no grupo ligadura + *Pg* não houve diferença significativa na análise comparativa dos períodos.

É esperado que em períodos maiores de tempo uma maior quantidade de biofilme tenha se acumulado na ligadura mantendo a reposta inflamatória, não havendo necessidade de associação com outros métodos de inoculação bacteriana. Duarte et al.¹² (2010) buscaram avaliar a composição do biofilme acumulado ao redor de ligaduras instaladas em ratos Wistar através de DNA checkerboard usando amostras de 40 espécies de bactérias da flora oral humana normalmente associadas com a doença periodontal. Um total de 25 espécies foram encontradas ao redor da ligadura instalada no primeiro molar dos ratos, algumas espécies em maior proporção e outras em menor proporção. Embora em pequena quantidade, a *Porphyromonas gingivalis* foi encontrada em 10 dos 12 animais utilizados na pesquisa, corroborando com os resultados observados por nosso grupo de estudos na análise de PCR-RT do grupo com ligadura, onde foi observado a presença de DNA de *Pg* (Figura 12). Além disso, Rovin et al.⁵⁶ (1966) não observaram o desenvolvimento de doença periodontal em ratos “germ-free” que foram submetidos à ligadura e Kenworthy, Baverel³⁰ (1981) observaram uma redução da progressão da doença periodontal em ratos que foram submetidos a uma terapia antimicrobiana durante a presença de ligaduras, confirmando ainda mais a relação direta dos microorganismos no desenvolvimento de DP em animais com ligadura.

7 CONCLUSÃO

Em nosso estudo, podemos concluir que, o modelo de ligadura foi eficiente e mais representativo da doença periodontal em humano, evidenciado por meio de significativa perda óssea alveolar e colonização por bactéria periodontopatógena. Por outro lado, o modelo de gavagem oral, seja por uma infecção simples ou mista, não foi efetivo em induzir doença nas condições estudadas.

REFERÊNCIAS*

1. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods*. 2013; 394 (1-2): 49-54.
2. 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.
3. Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Roopenian DC. Heterogeneity of *Porphyromonas gingivalis* strains in the induction of alveolar bone loss in mice. *Oral Microbiol Immunol*. 2000; 15 (1): 27-32.
4. Baker PJ, Dixon M, Roopenian DC. Genetic control of susceptibility to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in mice. *Infect Immun*. 2000; 68 (10): 5864-8.
5. Baumgartner JC, Falkler WA, Jr., Beckerman T. Experimentally induced infection by oral anaerobic microorganisms in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol*. 1992; 7 (4): 253-6.
6. Bendyk A, Marino V, Zilm PS, Howe P, Bartold PM. Effect of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on experimental periodontitis in the mouse. *J Periodontal Res*. 2009; 44 (2): 211-6.
7. Bezerra MM, Brito GA, Ribeiro RA, Rocha FA. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2002; 35 (5): 613-6.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/manualfoar.pdf>

8. Cantley MD, Bartold PM, Marino V, Reid RC, Fairlie DP, Wyszynski RN, et al. The use of live-animal micro-computed tomography to determine the effect of a novel phospholipase A2 inhibitor on alveolar bone loss in an in vivo mouse model of periodontitis. *J Periodontal Res.* 2009; 44 (3): 317-22.
9. Cantley MD, Haynes DR, Marino V, Bartold PM. Pre-existing periodontitis exacerbates experimental arthritis in a mouse model. *J Clin Periodontol.* 2011; 38 (6): 532-41.
10. Darveau RP, Hajishengallis G, Curtis MA. *Porphyromonas gingivalis* as a potential community activist for disease. *J Dent Res.* 2012; 91 (9): 816-20.
11. Duarte PM, Goncalves P, Casati MZ, de Toledo S, Sallum EA, Nociti FH, Jr. Estrogen and alendronate therapies may prevent the influence of estrogen deficiency on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J Periodontal Res.* 2006; 41 (6): 541-6.
12. Duarte PM, Tezolin KR, Figueiredo LC, Feres M, Bastos MF. Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 2010; 55 (2): 142-7.
13. Dumitrescu AL, Abd-El-Aleem S, Morales-Aza B, Donaldson LF. A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. *J Clin Periodontol.* 2004; 31 (8): 596-603.
14. Ebersole JL, Feuille F, Kesavalu L, Holt SC. Host modulation of tissue destruction caused by periodontopathogens: effects on a mixed microbial infection composed of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *Microb Pathog.* 1997; 23 (1): 23-32.
15. Faveri M, Figueiredo LC, Duarte PM, Mestnik MJ, Mayer MP, Feres M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2009; 36 (9): 739-49.

16. Ferreira LM, Ferreira LRK. Experimental model: historic and conceptual revision. *Acta Cir Bras*. 2003; 18 (spe):1-3.
17. Feuille F, Ebersole JL, Kesavalu L, Stepfen MJ, Holt SC. Mixed infection with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in a murine lesion model: potential synergistic effects on virulence. *Infect Immun*. 1996; 64 (6): 2094-100.
18. Fiehn NE, Klausen B, Evans RT. Periodontal bone loss in *Porphyromonas gingivalis*-infected specific pathogen-free rats after preinoculation with endogenous *Streptococcus sanguis*. *J Periodontal Res*. 1992; 27 (6): 609-14.
19. Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol*. 2006; 21 (1): 12-20.
20. Genco RJ, Grossi SG, Ho A, Nishimura F, Murayama Y. A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. *J Periodontol*. 2005; 76 (11 Suppl): 2075-84.
21. Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2008; 35 (2): 89-105.
22. Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa C, Jr. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Front Oral Biol*. 2012; 15 (1): 117-32.
23. Gyorfı A, Fazekas A, Suba Z, Ender F, Rosivall L. Neurogenic component in ligature-induced periodontitis in the rat. *J Clin Periodontol*. 1994; 21 (9): 601-5.

24. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994; 5 (1): 78-111.
25. Hardham J, Reed M, Wong J, King K, Laurinat B, Sfintescu C, et al. Evaluation of a monovalent companion animal periodontal disease vaccine in an experimental mouse periodontitis model. *Vaccine*. 2005; 23 (24): 3148-56.
26. Hochman B, Ferreira LM, Vilas Bôas FC, M M. Experimental model in hamsters (*Mesocricetus auratus*) to study heterologous graft of scars and cutaneous diseases in plastic surgery. *Acta Cir Bras*. 2005; 19 (Suppl. 1): 200-12.
27. Hoffman MM, Schour I. Quantitative studies in the development of the rat molar. II. alveolar bone, cementum and eruption. *Am J Orthod*. 1940; 26 (9): 854-74.
28. Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2005; 38 (1): 72-122.
29. Karimbux NY, Ramamurthy NS, Golub LM, Nishimura I. The expression of collagen I and XII mRNAs in *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis in rats: the effect of doxycycline and chemically modified tetracycline. *J Periodontol*. 1998; 69(1):34-40.
30. Kenworthy R, Baverel M. Studies of a periodontal tissue lesion in the rat, untreated or treated with chlorhexidine digluconate. *J Clin Periodontol*. 1981; 8 (4): 349-58.
31. Kesavalu L, Sathishkumar S, Bakthavatchalu V, Matthews C, Dawson D, Steffen M, et al. Rat model of polymicrobial infection, immunity, and alveolar bone resorption in periodontal disease. *Infect Immun*. 2007; 75 (4): 1704-12.

32. Kim ML, Jeong CM, Jeon YC, Byon E, Jeong Y, Cho LR. The effects of Mg-ion implantation and sandblasting on *Porphyromonas gingivalis* attachment. *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23 (2): 245-52.
33. Kimura S, Nagai A, Onitsuka T, Koga T, Fujiwara T, Kaya H, et al. Induction of experimental periodontitis in mice with *Porphyromonas gingivalis*-adhered ligatures. *J Periodontol.* 2000; 71 (7): 1167-73.
34. Kinane DF, Attstrom R, European Workshop in Periodontology group B. Advances in the pathogenesis of periodontitis. Group B consensus report of the fifth European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 (Suppl 6): 130-1.
35. Kirkwood KL, Cirelli JA, Rogers JE, Giannobile WV. Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2007; 43 (1): 294-315.
36. Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol.* 1991; 62 (1): 59-73.
37. Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 2004; 39 (2): 101-6.
38. Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Schmidt AM. A murine model of accelerated periodontal disease in diabetes. *J Periodontal Res.* 1998; 33 (7): 387-99.
39. Lalla E, Lamster IB, Hofmann MA, Bucciarelli L, Jerud AP, Tucker S, et al. Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23 (8): 1405-11.
40. Lee BC, Jung GY, Kim DJ, Han JS. Initial bacterial adhesion on resin, titanium and zirconia in vitro. *J Adv Prosthodont.* 2011; 3 (2): 81-4.

41. Li CH, Amar S. Morphometric, histomorphometric, and microcomputed tomographic analysis of periodontal inflammatory lesions in a murine model. *J Periodontol.* 2007; 78 (6): 1120-8.
42. Liu R, Bal HS, Desta T, Krothapalli N, Alyassi M, Luan Q, et al. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *J Dent Res.* 2006; 85 (6): 510-4.
43. Lopez NJ, Socransky SS, Da Silva I, Japlit MR, Haffajee AD. Subgingival microbiota of Chilean patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2004; 75 (5): 717-25.
44. Madeira MF, Queiroz-Junior CM, Costa GM, Werneck SM, Cisalpino D, Garlet GP, et al. Platelet-activating factor receptor blockade ameliorates *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease in mice. *Infect Immun.* 2013; 81 (11): 4244-51.
45. Meulman T, Peruzzo DC, Stipp RN, Goncalves PF, Sallum EA, Casati MZ, et al. Impact of *Porphyromonas gingivalis* inoculation on ligature-induced alveolar bone loss. A pilot study in rats. *J Periodontal Res.* 2011; 46 (5): 629-36.
46. Mkonyi LE, Bakken V, Sovik JB, Mauland EK, Fristad I, Barczyk MM, et al. Lymphangiogenesis is induced during development of periodontal disease. *J Dent Res.* 2012; 91 (1): 71-7.
47. de Molon RS, de Avila ED, Nogueira AV, de Souza JA, Avila-Campos MJ, de Andrade CR, et al. Evaluation of the Host Response in Various Models of Induced Periodontal Disease in Mice. *J Periodontol.* 2014; 85 (3): 465-77.
48. Nagayama M, Sato M, Yamaguchi R, Tokuda C, Takeuchi H. Evaluation of co-aggregation among *Streptococcus mitis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*. *Lett Appl Microbiol.* 2001; 33 (2): 122-5.

49. Nahid MA, Rivera M, Lucas A, Chan EK, Kesavalu L. Polymicrobial infection with periodontal pathogens specifically enhances microRNA miR-146a in ApoE^{-/-} mice during experimental periodontal disease. *Infect Immun*. 2011; 79 (4): 1597-605.
50. Odze RD, Marcial MA, Antonioli D. Gastric fundic gland polyps: a morphological study including mucin histochemistry, stereometry, and MIB-1 immunohistochemistry. *Hum Pathol*. 1996; 27 (9): 896-903.
51. Oz HS, Puleo DA. Animal models for periodontal disease. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011(1) : 1-8.
52. 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; 14 (1): 216-48.
53. Polak D, Shapira L, Weiss EI, Houry-Haddad Y. The role of coaggregation between *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* on the host response to mixed infection. *J Clin Periodontol*. 2012; 39 (7): 617-25.
54. Polak D, Wilensky A, Shapira L, Halabi A, Goldstein D, Weiss EI, et al. Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/*Fusobacterium nucleatum* infection: bone loss and host response. *J Clin Periodontol*. 2009; 36 (5): 406-10.
55. Rimondini L, Cerroni L, Carrassi A, Torricelli P. Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an in vitro and in vivo study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002; 17 (6): 793-8.
56. Rovin S, Costich ER, Gordon HA. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *J Periodontal Res*. 1966; 1 (3): 193-204.

57. Saadi-Thiers K, Huck O, Simonis P, Tilly P, Fabre JE, Tenenbaum H, et al. Periodontal and systemic responses in various mice models of experimental periodontitis: respective roles of inflammation duration and *Porphyromonas gingivalis* infection. *J Periodontol.* 2013; 84 (3): 396-406.
58. Saito Y, Fujii R, Nakagawa KI, Kuramitsu HK, Okuda K, Ishihara K. Stimulation of *Fusobacterium nucleatum* biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*. **Oral Microbiol Immunol.** 2008; 23 (1): 1-6.
59. Sallay K. Periodontal bone destruction. *Fogorv Sz.* 1982; 75 (8): 225-9.
60. Shemesh M, Tam A, Aharoni R, Steinberg D. Genetic adaptation of *Streptococcus mutans* during biofilm formation on different types of surfaces. *BMC Microbiol.* 2010; 10 (1): 51.
61. Sloan AJ, Taylor SY, Smith EL, Roberts JL, Chen L, Wei XQ, et al. A novel ex vivo culture model for inflammatory bone destruction. *J Dent Res.* 2013; 92 (8): 728-34.
62. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005; 38 (1): 135-87.
63. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25 (2): 134-44.
64. Struillou X, Boutigny H, Soueidan A, Layrolle P. Experimental animal models in periodontology: a review. *Open Dent J.* 2010; 4 (1): 37-47.
65. Tonetti MS, Claffey N, European Workshop in Periodontology group C. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 (Suppl 6): 210-3.

66. Weiss EI, Shanitzki B, Dotan M, Ganeshkumar N, Kolenbrander PE, Metzger Z. Attachment of *Fusobacterium nucleatum* PK1594 to mammalian cells and its coaggregation with periodontopathogenic bacteria are mediated by the same galactose-binding adhesin. *Oral Microbiol Immunol*. 2000; 15 (6): 371-7.
67. Wiebe CB, Adkins CA, Putnins EE, Hakkinen L, Larjava HS. Naturally occurring periodontal bone loss in the wild deer mouse, genus *Peromyscus*. *J Periodontol*. 2001; 72 (5): 620-5.
68. Wilensky A, Gabet Y, Yumoto H, Houry-Haddad Y, Shapira L. Three-dimensional quantification of alveolar bone loss in *Porphyromonas gingivalis*-infected mice using micro-computed tomography. *J Periodontol*. 2005; 76 (8): 1282-6.
69. Wilensky A, Polak D, Awawdi S, Halabi A, Shapira L, Houry-Haddad Y. Strain-dependent activation of the mouse immune response is correlated with *Porphyromonas gingivalis*-induced experimental periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2009; 36 (11): 915-21.
70. Yuan H, Gupte R, Zelkha S, Amar S. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand antagonists inhibit tissue inflammation and bone loss in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2011; 38 (11): 1029-36.
71. Yuan H, Zelka S, Burkatovskaya M, Gupte R, Leeman SE, Amar S. Pivotal role of NOD2 in inflammatory processes affecting atherosclerosis and periodontal bone loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110 (52): E5059-68.

ANEXOS

Autorização Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

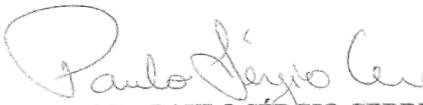
Proc. CEUA nº 13/2012

Araraquara, 14 de Setembro de 2012

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade reunida em 14/09/2012, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Alterações teciduais em dois modelos de indução de doença periodontal em camundongos. Análise histológica e por microtomografia computadorizada" (Proc. CEUA nº 13/2012) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para NOVEMBRO/2013.

Atenciosamente.


Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Coordenador da CEUA

Ao

Prof. Dr. JONI AUGUSTO CIRELLI
DD. Pesquisador Responsável
a/c Gustavo Tofoli e Rafael Scaf de Molon
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 17 de Março de 2014

VINÍCIUS IBIAPINA MASCARENHAS