



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

RAFAEL SCAF DE MOLON

Avaliação das Alterações Teciduais em Diferentes Modelos de
Indução de Doença Periodontal em Camundongos

ARARAQUARA

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

RAFAEL SCAF DE MOLON

Avaliação das Alterações Teciduais em Diferentes Modelos de
Indução de Doença Periodontal 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

2012

Molon, Rafael Scaf de

Avaliação das alterações teciduais em diferente modelos de indução de doença periodontal em camundongos / Rafael Scaf de Molon.-- Araraquara: [s.n.], 2012.

117 f. ; 30 cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

1. Doença periodontal 2. Porphyromonas gingivalis 3. Citocinas
I. Título

RAFAEL SCAF DE MOLON

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES TECIDUAIS EM
DIFERENTES MODELOS DE INDUÇÃO DE DOENÇA
PERIODONTAL EM CAMUNDONGOS**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

2º examinador: José Eduardo César Sampaio

3º examinador: Mario Taba Junior

Araraquara, 20 de março de 2012

DADOS CURRICULARES

RAFAEL SCAF DE MOLON

NASCIMENTO 06 de março de 1982 – São Paulo/SP

FILIAÇÃO: Antonio de Molon Filho
Sandra Scaf de Molon

2000-2004 Curso de Graduação em Odontologia pela
Universidade do Sagrado Coração - USC

2006-2008 Curso de Especialização em Implantodontia pela
Sociedade de Promoção Social do Fissurado Lábio
Palatal - PROFIS

2009-2011 Curso de Especialização em Periodontia pela
Faculdade de Odontologia de Araraquara da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”

2010-2012 Curso de Pós Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Dedicatória

A **Deus**, por estar presente em todos os momentos da minha vida, por sempre conduzir meus passos em busca do melhor caminho, pela força em todos os momentos difíceis e também pelos momentos de alegria e por ter sempre colocado na minha vida, pessoas maravilhosas que sempre me ajudaram a seguir em frente em busca de novas conquistas.

Aos meus pais **Antonio** e **Sandra**, pelo exemplo durante minha criação, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas, por todo amor, confiança e dedicação, por estarem sempre ao meu lado, permitindo que eu realize todos os meus sonhos e acima de tudo, pelo exemplo positivo que vocês foram e continuam sendo em minha vida.

A minha noiva **Érica**, quem eu amo, dedico esta dissertação e agradeço desde o primeiro momento pelo companheirismo, pelo tempo dedicado a me ajudar em todas as etapas deste trabalho e de tantos outros, e principalmente por todo amor e carinho que iluminaram a minha vida. Tudo o que conquistei nos últimos quase 5 anos, esta diretamente relacionado com a sua presença ao meu lado.

Aos meus irmãos **Gustavo**, **Melissa** e **Marina**, pelo incentivo, pelo apoio, carinho, compreensão e amizade.

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Dr. **Joni Augusto Cirelli**, pela orientação neste trabalho, pela confiança, respeito, competência, por acreditar em mim, pela maturidade que me fez adquirir durante a pós-graduação e principalmente pelo exemplo de pessoa, de ser humano e de profissional que sempre farão parte dos meus princípios.

A Prof^a. Dr^a. **Gulnara Scaf**, pelas primeiras orientações no desenvolvimento de trabalhos científicos, pela amizade, convívio, pelo apoio, confiança, e pelo exemplo de honestidade e de conduta profissional.

Aos amigos **Jão Paulo Steffens, Fausto Frizzera, Pablo Ramalho, Mario Verzola e Rubens Moreno**, acima de tudo pela amizade sincera conquistada, e por todos os momentos de alegria, companheirismo e convivência diária durante esses dois últimos anos. Tenho certeza que mesmo após o fim dos nossos cursos, nossa amizade permanecerá.

Agradecimentos

A faculdade de Odontologia de Araraquara, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. **José Cláudio Martins Segalla**, e Vice-Diretora Prof^{ca}. Dr^a. **Andréia Montandon Barreto**

Ao coordenador do curso de Pós-Graduação em Odontologia, Prof. Dr. **Mário Tanomaru Filho**, e a todos os docentes do Curso de Pós Graduação, pela competência, dedicação, responsabilidade e exemplo.

Aos amigos e Docentes de Disciplina de Periodontia, Prof. Dr. **Benedicto Egbert Corrêa de Toledo**, Prof. Dr. **Ricardo Samih Georges Abi Rached**, Prof. Dr. **Elcio Marcantonio Junior**, Prof. Dr. **José Eduardo César Sampaio**, Prof^{ca}. Dra. **Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio**, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Prof. Dr. **Carlos Rossa Junior**, Prof^{ca}. Dra. **Silvana Regina Perez Orrico**, pela formação, orientação e exemplo de dedicação e conduta profissional.

Aos Docentes da Disciplina de Fisiologia e Patologia, em especial o Prof. Dr. **Luis Carlos Spolidório** e ao Prof. Dr. **Cleverton Roberto de Andrade** pela ajuda na interpretação das lâminas histológicas e pela ajuda durante as etapas da imuno-histoquímica.

A Prof^ª. Dra. **Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga**, pela competência, exemplo e vontade em exercer a função de docente e pelos ensinamentos durante as Disciplinas de Genética e Biologia Molecular, que foram de grande valia para o meu crescimento durante o desenvolvimento deste projeto.

Aos meus amigos do curso de Pós-Graduação em Periodontia, **Fabiana, Fausto, Fernanda, Felipe, Giovana, Livia, Luis Guilherme, Marcell, Pablo, Sabrina, João Antonio, João Paulo, Rubinho, Lucas, Guilherme, Chaine, Livia, Andressa, Telma, Alinny, Michelle, Nicolau, Jonatas, Felipe Coletti, Mario, Leila, Samia, Sabrina Aquino, Luana e Morgana** pela amizade e pelos inesquecíveis momentos de convivência.

Aos amigos **Andressa** e **João Antonio** por toda a ajuda durante a realização dos experimentos e pela amizade sincera.

Ao Prof. Dr. **Manuel Damião de Sousa Neto**, do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia da USP – Ribeirão Preto, que permitiu a utilização do micro-tomógrafo.

A **Regina Lúcia** pela paciência, competência e cooperação em todos os momentos.

A **Claudinha** e ao **Leandro**, por toda a ajuda durante a realização dos cortes histológicos.

A todos os funcionários da Disciplina de Periodontia, **Regina Lúcia, Cláudia, D. Maria do Rosario, Maria José e Esther**, pela amizade, carinho e respeito que sempre me dispensaram.

Aos Docentes do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Prof. Dr. **Mario Francisco Real Gabrielli**, Prof. Dr. **Eduardo Hochuli Vieira**, Prof. Dr. **Valfrido Antonio Pereira Filho**, Prof^a. Dr^a. **Marisa Aparecida Cabrini Gabrielli**, Prof. Dr. **Roberto Henrique Barbeiro**, Prof. Dr. **José Scarso Filho**, pelos trabalhos realizados em parceria e pela orientação e exemplo.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pela competência, paciência e pela colaboração dedicada.

Aos funcionários da biblioteca: **Marley, Adriano, Ceres, Eliana e Sílvia** pela colaboração.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido, indispensável para a realização deste trabalho, por permitir e subsidiar a minha vida em Araraquara.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra colaboraram, para a realização deste trabalho.

“Eu não tenho aprendido grandes coisas,
nas minhas próprias pesquisas.
Eu não sou Watson ou Crick.
Eu tenho aprendido pequenas coisas.
Mas para aprender alguma coisa,
que ninguém soube antes,
o que cada um deveria ter
era a oportunidade de fazer.”

Maxine Singer

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	15
RESUMO.....	20
ABSTRACT.....	22
INTRODUÇÃO.....	25
REVISÃO DA LITERATURA.....	28
PROPOSIÇÃO.....	45
MATERIAL E MÉTODO.....	47
Obtenção e manutenção de animais.....	48
Delineamento Experimental.....	48
Indução de Doença Periodontal.....	50
Coleta de Material e Análises.....	55
Avaliação Histológica Descritiva.....	56
Extração de RNA total, Transcrição reversa e PCR em tempo real.....	57
Microtomografia Computadorizada – μ CT.....	60
Análise Estatística.....	64
RESULTADO.....	65

Análise histológica descritiva.....	66
Microtomografia Computadorizada - μ CT.....	78
RT-PCR em Tempo Real.....	84
DISCUSSÃO.....	88
CONCLUSÃO.....	98
REFERÊNCIAS.....	100
ANEXOS.....	114

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 (A e B) – Mesa operatória e posicionamento do animal para permitir uma manutenção adequada da abertura bucal e de visibilidade, facilitando o acesso aos dentes da região posterior da maxila.

FIGURA 2 (A e B) – Colocação de ligadura com fio de nylon 6.0 ao redor do primeiro molar maxilar bilateralmente, com auxílio de instrumental adequado, para permitir a indução da doença periodontal experimental.

FIGURA 3 – Inoculação bacteriana pelo método de gavagem. Os animais eram imobilizados e com o auxílio de uma micropipeta, a solução contendo as bactérias, era aplicada diretamente na cavidade oral.

FIGURA 4 – Injeção bacteriana utilizando uma microseringa na mucosa palatina, ao redor do primeiro e segundo molar, para indução da doença periodontal experimental.

FIGURA 5 (A e B) – Aparelho utilizado para anestesia inalatória com gás isoflurano. Caixa acrílica para colocação dos animais, onde era acumulado o gás anestésico, permitindo apropriada analgesia.

FIGURA 6 – Representação nos três planos (Frontal, Coronal e Transaxial) para padronização das medições antes de cada análise linear e volumétrica.

FIGURA 7 (A e B) – Representação esquemática da mensuração linear na face palatina das raízes distal do primeiro molar e mesial do segundo molar, para avaliação da distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar.

FIGURA 8 – Representação em um corte transaxial da área de interesse (ROI) delimitado a partir da raiz distal do segundo molar até a raiz mesial do primeiro molar, englobando o tecido ósseo da região interproximal e região de furca do segundo molar.

FIGURA 9 (A a D) – Fotomicrografia da região do primeiro molar superior esquerdo dos animais do grupo controle, dos períodos de 7 (A) e 30 dias (C). H&E. Aumento de 50x (B) e 100x (D)

FIGURA 10 (A a D) – Fotomicrografia da região do primeiro molar superior esquerdo dos animais do grupo ligadura, dos períodos de 7(A) e 30(C) dias. H&E. Aumento de 50x (B) e 100x (D)

FIGURA 11 (A a D) – Fotomicrografia da região do primeiro molar superior esquerdo dos animais do grupo inoculação bacteriana, dos períodos de 7(A) e 30(C) dias. H&E. Aumento de 50x(B) e 100x(D)

FIGURA 12 (A a D) – Fotomicrografia da região do primeiro molar superior esquerdo dos animais do grupo inoculação bacteriana, dos períodos de 7(A) e 30(C) dias. H&E. Aumento de 50x (B) e 100x (D)

FIGURA 13 (A a D) – Fotomicrografia da região do primeiro molar superior esquerdo dos animais do grupo injeção de *Porphyromonas gingivalis* inativadas por calor , dos períodos de 7(A) e 30(C) dias. H&E. Aumento de 50x(B) e 100x(D)

FIGURA 14 - Quantificação do processo inflamatório em todos os grupos
*Indica diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo C. ANOVA (p<0.05)

FIGURA 15 - Quantificação do número de vasos presentes nos diferentes grupos experimentais. *Indica diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo C. ANOVA ($p < 0.05$)

FIGURA 16 – Medida linear do defeito ósseo nos diferentes grupos experimentais do período de 30 dias. * Indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos C, G-Pg e G-PgFn. ANOVA, ($p < 0.05$).
&Indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos C, G-Pg, e G-PgFn. ANOVA ($p < 0.05$)

FIGURA 17 – Volume do defeito ósseo entre os diferentes grupos experimentais do período de 30 dias. As barras nos gráficos indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão de 6 amostras de todos os grupos. *Indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos C, G-Pg, e G-PgFn. ANOVA, ($p < 0.05$). &Indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos C, G-PgFn. ANOVA ($p < 0.05$)

FIGURA 18 – Fotomicrografia das raízes palatinas do primeiro e segundo molar superior no grupo injeção bacteriana. É possível notar (seta) evidente perda óssea na região interproximal, estatisticamente significativa com relação ao grupo controle.

FIGURA 19 - Fotomicrografia do grupo ligadura evidenciando (seta) aumento da perda óssea alveolar na região interproximal, entre o primeiro e o segundo molar, estatisticamente significativa em relação aos demais grupos.

FIGURA 20 – Fotomicrografia do grupo controle.

FIGURAS 21 a 23. Reconstrução tridimensional volumétrica dos grupos L (A), I-Pg (B) e C (C), respectivamente, na região palatina.

FIGURA 24 - *Fold-change* (Média e desvio-padrão) da expressão de TNF- α , nos diferentes grupos de tratamento nos períodos de 7 e 15 dias. *Indica diferença estatisticamente significativa com relação aos grupos G-Pg, G-PgFn e I-Pg. &Indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos G-Pg, G-PgFn e I-Pg ANOVA e Tukey's test ($p < 0.05$).

FIGURA 25 - *Fold-change* (Média e desvio-padrão) da expressão de IL-1 β , nos diferentes grupos de tratamento nos períodos de 7 e 15 dias. *Indica diferença estatisticamente significativa com relação aos grupos L, G-Pg, G-PgFn e I-Pg. &Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo G-Pg e I-Pg ANOVA e Tukey's test ($p < 0.05$).

FIGURA 26 - *Fold-change* (Média e desvio-padrão) da expressão de IL-6, nos diferentes grupos de tratamento nos períodos de 7 e 15 dias. *Indica diferença estatisticamente significativa com relação aos grupos C, G-Pg, G-PgFn e I-Pg. &Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo G-Pg, G-PgFn ANOVA e Tukey's test ($p < 0.05$).

FIGURA 27 - *Fold-change* (Média e desvio-padrão) da expressão de OPG, nos diferentes grupos de tratamento nos períodos de 7 e 15 dias. *Indica diferença estatisticamente significativa com relação aos grupos G-Pg, G-PgFn e I-Pg. &Indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos G-Pg, G-PgFn e I-Pg ANOVA e Tukey's test ($p < 0.05$).

FIGURA 28 -*Fold-change* (Média e desvio-padrão) da expressão de RANKL, nos diferentes grupos de tratamento nos períodos de 7 e 15 dias. *Indica diferença estatisticamente significativa com relação aos grupos C, G-Pg, G-PgFn e I-Pg. ANOVA e Tukey's test ($p < 0.05$).

MOLON RS. Avaliação das alterações teciduais em diferentes modelos de indução de doença periodontal em camundongos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP; 2012.

RESUMO

A periodontite é uma doença infecciosa caracterizada pela destruição do tecido ósseo alveolar, mediada e modulada pelo hospedeiro frente aos microrganismos provenientes do biofilme dental. Compreender a origem e a evolução da reabsorção de osso alveolar é uma das metas primordiais da pesquisa periodontal, sobretudo visando o estabelecimento de novas modalidades terapêuticas. O desenvolvimento de modelos experimentais torna-se importante e é um passo necessário antes de ingressar em experimentações clínicas com novas terapias de tratamentos. Sendo assim, o presente estudo apresenta como objetivos caracterizar e avaliar as alterações teciduais provocadas por diferentes modelos de doença periodontal experimental em camundongos. Para isto, foram utilizados camundongos *C57/BL6 wild type* (WT), fêmeas distribuídas em 5 grupos experimentais seguindo os períodos de sacrifício: 7, 15 e 30 dias após o início da indução da doença (n=6 animais/período/grupo). O Grupo C correspondeu ao grupo controle; no Grupo L a doença periodontal foi induzida por meio de ligaduras; nos Grupos G-Pg e G-PgFn foram realizadas gavagem com *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas gingivalis* + *Fusobacterium nucleatum* respectivamente; no Grupo I-Pg foi injetado *Porphyromonas gingivalis* inativada por calor na mucosa palatina entre os molares. As amostras

obtidas foram utilizadas para avaliação do processo imuno-inflamatório presente no tecido gengival, por meio de análise histológica descritiva, e RT-PCR em tempo real. A avaliação da perda óssea alveolar foi avaliada por microtomografia comutadorizada (μ CT). Apenas os modelos de ligadura e de injeção de *Porphyromonas gingivalis* inativada por calor apresentaram significativa perda óssea alveolar, no período de 30 dias, comparado ao grupo controle e os demais grupos. Houve aumento significativo ($p < 0.05$) na expressão gênica do mediador inflamatório IL-6 e na proteína RANKL envolvida no processo de osteoclastogenese no grupo ligadura em relação ao grupo controle. Os modelos de ligadura e de injeção de *Porphyromonas gingivalis* inativada por calor foram os mais representativos da doença periodontal em humanos, enquanto que os modelos de gavagem não foram efetivos em induzir doença, nas condições estudadas.

Palavras-chave: doença periodontal; *Porphyromonas gingivalis*; citocinas.

MOLON RS. Evaluation of tissue changes in different models of induced periodontal disease in mice [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

ABSTRACT

Periodontitis is an infectious disease characterized by the destruction of alveolar bone tissue, mediated and modulated by the host response against the microorganisms from the biofilm. Understanding the origin and evolution of the alveolar bone resorption is one of the primary goals of periodontal research, especially to stop the disease progression and improve future treatments. For this, the development of experimental models is important and a necessary step before entering into clinical trials with new treatment therapies. Therefore, the aim of this study was to characterize and evaluate tissue changes caused by different experimental models of periodontal disease in mice. We used C57/BL6 *wild type* mice (WT), females, distributed into 5 experimental groups and sacrificed at 7, 15 and 30 days after periodontal disease induction (n=6 animals/period/group). Group C was the control group; Group L periodontal disease was induced by ligature; in Groups G-Pg and G-PgFn oral gavage with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* + *Porphyromonas gingivalis* were performed, respectively; in Group I-Pg heat killed *Porphyromonas gingivalis* was injected in the palatal mucosa between the molars. The samples were used for analysis of the immune-inflammatory process in the gingival tissue by histological descriptive analysis and real time RT-PCR analyses. The alveolar bone loss was evaluated by

micro-computerized tomography (μ CT). Only ligature and injection of *Porphyromonas gingivalis* heat-killed models showed significant alveolar bone loss in 30 day period compared to the control and the others groups. There were a significant increase ($p < 0.05$) in gene expression of inflammatory mediator IL-6 and proteins involved in osteoclastogenesis RANKL in ligature group compared with the control group. The ligature and injection of heat-killed *Porphyromonas gingivalis* models were the most representative of periodontal disease in humans, while oral gavage models were not effective to induce the disease, in the studied conditions.

Key Words: Periodontal disease; *Porphyromonas gingivalis*; cytokines.

INTRODUÇÃO

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 humanos⁶³. Na periodontite, o biofilme dental tem se mostrado como o fator etiológico primário no início da inflamação gengival e subsequente destruição dos tecidos periodontais³⁸. 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 tecidual⁴⁹⁻⁵⁰.

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 utilizados³⁴. 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 envolvidos³⁴.

Por outro lado, a variabilidade de modelos encontrada na literatura impede, muitas vezes, uma comparação direta entre os resultados e conclusões dos 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.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

Microbiologia da Doença Periodontal

Socransky et al.⁸⁰ (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 seqüência 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.⁶² (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 e Haffjee (2005)⁸¹ identificaram as *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 inserção⁴⁷.

Considerável atenção tem sido dada à *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, bactérias estas, associadas com a periodontite crônica e periodontite agressiva localizada, respectivamente⁴². Favari et al.²¹ (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. Essas bactérias gram-negativas apresentam moléculas de lipopolissacarídeo (LPS) nas paredes celulares que atuam como endotoxinas responsáveis por desencadear a resposta imune do hospedeiro, resultando em reação inflamatória.

Holt, Ebersole⁴² (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 periodontal³⁷. Como exemplo, o *Fusobacterium nucleatum*, comumente encontrado no biofilme subgengival 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.⁸ (1992), Feuille et al.²³ (1996) e Ebersole et al.¹⁸ (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.

Participação da Resposta Imune-Inflamatória do Hospedeiro na Doença Periodontal

Embora a exposição dos tecidos gengivais aos periodontopatógenos seja um pré-requisito para a inflamação e destruição tecidual, apenas a sua presença não é suficiente para explicar o início e a progressão da doença. Uma vez iniciado os processos inflamatórios e imunes, várias moléculas como: metaloproteínas, citocinas, prostaglandinas e outras enzimas do hospedeiro são liberadas pelos leucócitos, fibroblastos e outras células residentes³³. Embora estas reações teciduais supostamente protejam o hospedeiro da invasão microbiana, a relativa inacessibilidade dos leucócitos e de fatores antimicrobianos aos micro-organismos no sulco gengival, somada a sua organização na forma de biofilme, inviabiliza a eliminação dos agentes infecciosos^{75,78}. Assim, há uma perpetuação do processo imuno-inflamatório que leva à destruição dos próprios tecidos do hospedeiro. Além disso, fatores de riscos ambientais e adquiridos como: diabetes mellitus, tabaco, estresse, e traços genéticos como os polimorfismos da IL-1, podem agravar a resposta inflamatória do hospedeiro frente ao desafio bacteriano e favorecer o avanço da doença⁵⁴.

Dentre as proteases envolvidas na degradação e remodelação de proteínas da matriz extracelular, estão as metaloproteases da matriz (MMPs). Estas desempenham papel tanto em processos fisiológicos como patológicos e constituem uma família de proteases neutras cuja atividade é dependente de íons metálicos cálcio e zinco⁸⁷. A principal função das MMPs é catalisar a quebra de proteínas na membrana plasmática das células ou da matriz extracelular⁷¹. Células

dos tecidos periodontais, incluindo os fibroblastos, queratinócitos, neutrófilos, macrófagos, e as células endoteliais, constituem a fonte primária de MMPs. Estudos experimentais indicam que a ativação das MMPs desempenha um importante papel na degradação da matriz extracelular durante a destruição dos tecidos periodontais¹². A ativação das MMPs é regulada por um grupo de proteínas endógenas, chamadas de inibidores teciduais de metaloproteases (TIMPs), capazes de inibir praticamente todos os membros da família das MMPs³. Em condições fisiológicas, os TIMPs estão em balanço com as MMPs sendo a matriz extracelular remodelada de forma extremamente controlada. Em tecidos periodontais inflamados, há um desequilíbrio entre as MMPs e TIMPs com elevação dos níveis de MMPs sem o concomitante aumento na expressão dos TIMPs. Este desequilíbrio acelera a destruição dos componentes da matriz extracelular provocando perda de inserção clínica e perda óssea alveolar⁶⁸.

Além da destruição do tecido conjuntivo, a reabsorção óssea alveolar é um evento chave nas doenças periodontais. A descoberta de uma nova proteína chamada osteoprotegerina (OPG) revelou a chave dos mecanismos regulatórios na atividade e na diferenciação dos osteoclastos⁷⁷. A integridade do tecido ósseo depende da manutenção de um equilíbrio entre a reabsorção óssea pelos osteoclastos e a formação óssea pelos osteoblastos. A proteína RANKL (ligante do receptor de ativação do fator nuclear κ B), o respectivo receptor RANK (receptor de ativação do fator nuclear κ B), e a osteoprotegerina (OPG), constituem os componentes moleculares do sistema de remodelação óssea. A ligação RANKL a RANK, expresso nos precursores de osteoclastos, é o principal

evento estimulatório para sua diferenciação e posterior ativação. Os efeitos de RANKL são regulados pela OPG que, por sua vez, inibe a reabsorção óssea impedindo a interação entre RANK e RANKL⁴⁵. Alterações no balanço entre a expressão das proteínas RANKL e OPG definem a patogênese de diversas patologias ósseas⁷⁷. Na condição de doença periodontal, elevados níveis de RANKL podem ser encontrados no fluido gengival e no tecido periodontal justificando a reabsorção do osso alveolar²⁶. Estas enzimas e proteínas são reguladas pela produção de citocinas pró e anti-inflamatórias nos tecidos periodontais que, por sua vez, determinam o curso e/ou severidade da doença.

As citocinas são pequenos polipeptídeos, com um amplo espectro de propriedades inflamatórias, metabólicas e imunomoduladoras e são produzidas por uma variedade de células, incluindo os macrófagos/monócitos, as células dendríticas, linfócitos, neutrófilos, células endoteliais e fibroblastos¹¹. Na presença de microrganismos ou outros antígenos, estas células secretam as citocinas e desencadeiam as reações imunes e inflamatórias. No entanto, quando sintetizadas em níveis elevados, as citocinas modificam o padrão de resposta celular, participando substancialmente no desenvolvimento de patologias de caráter inflamatório crônico, como é o caso das doenças periodontais²⁴.

Sendo o padrão de resposta inflamatória/imune regulado pelas citocinas, existem abundantes evidências de alterações na expressão destas moléculas imunorreguladoras, com elevados níveis de TNF- α (tumor necrosis factor α), IL-1 β (interleukin-1 beta), IL-6 (interleukin-6) e PGE2 (prostaglandin E2)

encontrados em sítios doentes em comparação aos presentes em condições de saúde clínica^{19,28}.

Os mediadores inflamatórios TNF- α e IL-1 β são descritos como indutores ou potencializadores da produção de MMPs e da expressão de fatores de diferenciação e ativação de osteoclastos, com consequente degradação de tecido conjuntivo e reabsorção óssea^{13,32,72}. IL-1 β e TNF- α podem induzir a regulação de moléculas de adesão nos leucócitos e nas células endoteliais e estimular a produção de quimiocinas necessárias para recrutar os leucócitos circulantes e ativar as integrinas, envolvidas na adesão das células ao vaso.

Essas citocinas podem induzir a expressão de novos mediadores, como as prostaglandinas, que ampliam ou mantêm a resposta inflamatória^{16,67}.

Essas observações foram, também, constatadas nos estudos de Assuma et al.² (1998) e Delima et al.¹⁴ (2001) que mostraram o papel das citocinas em modelo de primatas não-humanos. Os autores concluíram que a inibição da IL-1 e do TNF- α reduzia a progressão da perda óssea periodontal e da perda de inserção devido à inibição do recrutamento de células inflamatórias (principalmente monócitos e linfócitos) para o osso. Outros autores observaram que camundongos com deficiência na expressão de IFN- γ , IL-6 e TNF- α apresentaram redução da perda óssea alveolar em modelos de gavagem^{7,29}. Esta descoberta apoiou a hipótese de que as citocinas são partes integrantes no processo da doença e proporcionou um melhor entendimento sobre a progressão e formas de tratamento.

Outra importante citocina é a Interleucina-6 (IL-6). Esta é produzida por monócitos, macrófagos e fibroblastos e é um dos mais importantes mediadores da resposta inflamatória, com função pró ou anti-inflamatórias. Várias doenças inflamatórias, incluindo a periodontite, têm sido associadas com níveis elevados de IL-6. Estas citocinas estimulam as MMPs a destruírem os tecidos por meio da degradação dos componentes da matriz extracelular¹. Ademais, a IL-1 e o TNF- α induzem a reabsorção óssea por estimulação indireta da IL-6 ou pela estimulação direta dos efetores associados com a osteoclastogênese, tais como RANKL²⁷.

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 representar²¹.

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 cirúrgicas⁸³. 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 estudar⁴⁰.

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 doença¹⁷. 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 questão²². Contudo, encontrar um modelo animal de doença periodontal, que reproduza todos os aspectos da doença humana é uma meta impossível³⁰.

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 camundongos⁸².

Os camundongos apresentam algumas características comparáveis à doença humana como a incidência da doença periodontal e a suscetibilidade à indução experimental de doença periodontal⁸⁵. 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 bacteriana⁵¹, introdução de microorganismos patogênicos por meio de gavagem²⁴ e por meio de injeções de bactérias inativadas⁹ ou LPS bacteriano⁵¹. 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 1966⁷¹ e é atualmente considerado 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 óssea⁵¹.

Em ratos, a perda dos tecidos de inserção e perda óssea ocorre previsivelmente em um período de 7 dias⁹. 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 várias espécies bacterianas comumente encontradas em humanos, como a *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*¹⁶.

Em ratos livres de microrganismos (gnotobióticos), a colocação de ligaduras não induz a uma significativa inflamação gengival ou perda óssea⁷¹, 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 modelos⁴⁶. 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^{48,60,89}. 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 óssea³⁷.

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^{41,56}.

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 semanas⁴⁴. Após este período é esperado uma diminuição na intensidade da destruição tornando-se uma reação crônica.

LPS Bacteriano

Outro modelo comumente utilizado é a injeção localizada de lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano. O LPS é um constituinte da parede celular de, praticamente, todos os organismos Gram-negativos. Estas moléculas são conhecidas por induzirem a infiltração de leucócitos polimorfonucleares, edema e dilatação vascular em tecidos periodontais inflamados⁶⁵. É sabido, também, que o LPS pode ativar os osteoclastos por meio de um efeito direto sobre os leucócitos circulantes sem nenhum envolvimento dos osteoblastos⁴³. Em diversos estudos, a utilização do LPS de *A. actinomycetemcomitans* mostra resultados eficazes no desenvolvimento de periodontite experimental em ratos⁷⁰.

Os lipopolissacarídeos bacterianos promovem significativa inflamação gengival e periodontal com aumento de expressões de citocinas inflamatórias, migração apical do epitélio juncional, estimulação da osteoclastogênese e perda óssea alveolar^{17,70}.

Em conclusão, a injeção localizada de LPS bacteriano pode ser um método mais direto e controlado de indução de doença periodontal uma vez que a doença

é induzida por um periodontopatógeno conhecido e o tempo de infecção é preciso^{27,70}.

Gavagem Oral

A introdução de cepas de bactérias humanas por gavagem oral e o subsequente impacto sobre o periodonto tem sido estudados em vários modelos de roedores⁵¹. 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^{7,57}. Posteriormente, este modelo foi replicado utilizando outros patógenos, incluindo *A. actinomycetemcomitans*²⁸, *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas gulae*, um periodontopatógeno encontrado em animais equivalente a *P. gingivalis* em humanos³⁹. A perda óssea substancial, normalmente, demora mais de quatro semanas e é mensurado histologicamente por análise morfométrica ou por tomografia computadorizada^{28,86}.

Dada à 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 intermídia* e *Fusobacterium*

*nucleatum*⁵¹. 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 e as características da infecção causada por esses organismos e as interações sinérgicas foram avaliados⁴⁷. 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 de 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 foram determinados em tecidos periodontais e a infecção mista (*P. gingivalis*, *F. nucleatum*) apresentou características mais destrutivas que a mono infecção⁶⁸.

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 tecidual⁷.

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 ateroscleróticas⁵⁹. 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 bloqueado⁵⁷⁻⁵⁸. A utilização de modelos de gavagem oral para tratar uma grande variedade de hipóteses relacionadas à patogênese periodontal, foi avaliado variando o papel da

resposta do hospedeiro às características de virulência de periodontopatógenos suspeitos e a interligação destes fatores com os parâmetros sistêmicos³⁴.

Injeção de bactérias inativadas por calor (*heat killed*)

A introdução de bactérias inativadas por calor e o subsequente impacto sobre o periodonto têm sido estudados por pesquisadores, principalmente em estudos *in vitro* com células epiteliais gengivais humanas²⁰. Como principal variação comparada à utilização de bactérias vivas, este método exclui os efeitos das proteases e de outras proteínas, que são produzidas pelo metabolismo bacteriano além de, obviamente, não ocorrer colonização bacteriana, o que exige estímulos constantes durante todo o experimento.

Um estudo experimental *in vivo* foi desenvolvido para mimetizar as reações inflamatórias crônicas e sistêmicas ocorridas em doenças infecciosas em seres humanos¹⁰. Para identificar os meios imunológicos que induzem a regulação do receptor ζ e entender o mecanismo de regulação e danos sofridos pelas células T, os autores injetaram *Porphyromonas gingivalis* inativadas por calor no subcutâneo de camundongos saudáveis. Os autores demonstraram uma diminuição na regulação da expressão do receptor ζ nas células T, causando danos a estas células e uma redução da resposta imune. Tem sido sugerido que na presença de inflamação crônica, a persistência da diminuição da regulação do receptor ζ , pode impedir uma recuperação completa, ao alterar as respostas imunes. Assim, ao invés de resolver a situação, tal resposta pode contribuir ainda mais para a resposta patológica¹⁰.

Em um estudo com camundongos foi demonstrado, que a injeção de *Porphyromonas gingivalis* inativadas por calor estimulou a reabsorção óssea com a mesma intensidade dos micro-organismos vivos, sugerindo que os efeitos são devidos a estimulação direta dos osteoclastos pelos produtos das células bacterianas ou pela estimulação indireta dos osteoblastos por produtos, tais como as citocinas, liberados localmente pelas células do hospedeiro⁹⁰.

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.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi caracterizar e avaliar comparativamente as alterações teciduais provocadas por diferentes modelos de doença periodontal experimental em camundongos.

Objetivos específicos:

- Avaliar a destruição óssea alveolar produzida pelos diferentes modelos de indução de doença periodontal, por meio de microtomografia computadorizada - μ CT
- Avaliar a intensidade e característica do processo inflamatório provocado nos tecidos periodontais pelos diferentes métodos de indução de doença periodontal, por meio de análise histológica descritiva.
- Avaliar a expressão gênica das citocinas inflamatórias Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-1 (IL-1) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e das proteínas Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B (RANKL) e Osteoprotegerina (OPG) por meio de RT-PCR em tempo real.

MATERIAL E MÉTODO

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 12/2010 (Anexo 1). 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 06 animais de cada grupo, por período experimental. Os animais foram distribuídos em 5 grupos experimentais seguindo os períodos de sacrifício: 7, 15 e 30 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, realizados em ratos, nos quais se empregou o método de indução da doença periodontal por meio de

ligadura. Assim, o período de 7 dias correspondeu ao início da agressão ou período precoce do desenvolvimento da resposta imune-inflamatória nos tecidos periodontais. Os períodos de 15 e 30 dias foram considerados representativos da doença instalada, nos quais se esperava observar níveis variados de destruição periodontal, de acordo com o modelo utilizado.

Os animais foram distribuídos 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 nos animais do período de 15 e 30 dias e 3 inoculações nos animais do período de 7 dias.
- Grupo G-PgFn – Gavagem de *Porphyromonas gingivalis* + *Fusobacterium nucleatum*: indução de doença periodontal por meio da 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 nos animais dos períodos de 15 e 30 dias e 3 inoculações nos animais do período de 7 dias.
- Grupo I-Pg – Injeção de *Porphyromonas gingivalis* inativada por calor – (*heat killed*): indução de doença periodontal por meio de injeção de *Pg*

inativada por calor na mucosa palatina ao redor dos molares superiores, três vezes por semana, durante todo o período do experimento.

Indução de Doença Periodontal

Neste estudo, foram utilizados 3 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 foram posicionados em mesa operatória apropriada (Figura 1A e B), 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 2A e B). Neste modelo de indução de doença periodontal, o acúmulo de microorganismos 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 (A e B) – Mesa operatória e posicionamento do animal para permitir uma manutenção adequada da abertura bucal e de visibilidade, facilitando o acesso aos dentes da região posterior da maxila.

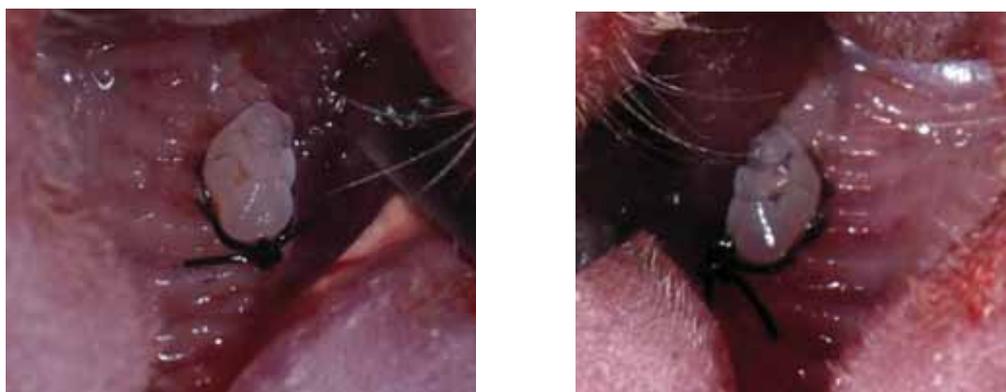


FIGURA 2 (A e B) – Colocação de ligadura com fio de nylon 6.0 ao redor do primeiro molar maxilar bilateralmente, com auxílio de instrumental adequado, para permitir a indução da doença periodontal experimental.

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) foram provenientes da bacterioteca do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Resumidamente, *Porphyromonas gingivalis* foi cultivada em meio ágar sangue suplementado com 1µL/mL de menadiona, 5µL/mL de hemina e 40µL/mL de kenamicina, de modo a suprir suas necessidades nutricionais e mantidas em jarra de anaerobiose contendo 90% de N₂ e 10% de CO₂ em estufa a 37°C por 10 dias. *Fusobacterium nucleatum* foi cultivado em placa de ágar sangue (5% de sangue de ovelha desfibrinado) a 35°C sob condições de anaerobiose (90% de N₂ e 10% de CO₂). A pureza das colônias foi confirmada por método de Gram e por visualização em estereoscópio. Uma vez colhidos da placa, os micro-organismos foram transferidos para um tubo de microcentrífuga com 100 µl de PBS. Alíquotas de 100 µl da amostra foram diluídas em água peptonada e semeadas em placa de petri. As diluições foram realizadas em triplicata. Após a incubação, as placas foram examinadas em microscópio estereoscópico para a caracterização morfológica e contagem do número total de unidades formadoras de colônias (UFC). Para a contagem dos micro-organismos foi escolhida uma placa que continha entre 30 e 300 UFCs. A solução foi diluída de modo a atingir a concentração de 10⁹ UFC em 100 µl de PBS. Os grupos de animais infectados foram submetidos ao protocolo que consiste da inoculação oral de 10⁹ UFC em 100 µl de VMGA, acrescida de 2% de carboximetilcelulose, sendo esta solução aplicada diretamente na cavidade oral dos animais com o auxílio de um

micropipetador (Figura 3) onde foram feitas 5 inoculações nos animais dos períodos de 15 e 30 dias, e 3 inoculações nos animais do período de 7 dias.



FIGURA 3 – Inoculação bacteriana pelo método de gavagem. Os animais eram imobilizados e com o auxílio de uma micropipeta, a solução contendo as bactérias, era aplicada diretamente na cavidade oral.

Injeção bacteriana: O protocolo para injeção bacteriana consiste na injeção bilateral de 0,5µl de 1×10^{10} UFC/ml de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) inativada por calor (*heat killed*)¹⁰ na mucosa mastigatória da região palatina dos molares, com o auxílio de uma microseringa (HP Agilent Technologies) (Figura 4). Previamente, *Porphyromonas gingivalis* foram inativadas pela incubação em uma suspensão a 60°C durante 5 minutos. As injeções foram repetidas 03 vezes por semana, bilateralmente, durante toda a duração do experimento. Para isso, os animais receberam anestesia inalatória com isofluorano (Figura5A e B) e foram posicionados na mesa operatória.



FIGURA 4 – Injeção bacteriana utilizando uma microseringa na mucosa palatina, ao redor do primeiro e segundo molar, para indução da doença periodontal experimental.



FIGURA 5 (A e B) – Aparelho utilizado para anestesia inalatória com gás isoflurano. Caixa acrílica para colocação dos animais, onde era acumulado o gás anestésico, permitindo adequada analgesia.

Coleta de Material e Análises

Após 7, 15 e 30 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 foram utilizadas para obtenção de material para a análise de RT-PCR em tempo real e micro CT.

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, foram incluídas em parafina.

Cortes seriados de 4 μ m de espessura foram obtidos no plano frontal, montados em lamínas e corados com hematoxilina e eosina (H/E). Estes cortes foram utilizados para avaliação do processo inflamatório por histologia descritiva.

As outras hemi-arcadas foram utilizadas para as seguintes análises:

- RT-PCR em tempo real: expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias: Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-1 β (IL-1 β) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF α) e das proteínas Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B (RANKL) e Osteoprotegerina (OPG).
- Microtomografia Computadorizada (μ CT): avaliação volumétrica e linear da perda óssea alveolar.

Para estas hemi-arcadas, imediatamente após o sacrifício dos animais, os tecidos gengivais ao redor dos dentes envolvidos foram coletados, congelados em nitrogênio líquido, colocados em tubos individuais e transferidos para freezer - 80°C, para posterior extração de RNA. Em seguida as mesmas peças contendo os dentes e processos alveolares foram fixadas em formol 4% por 24h, e transferidas posteriormente para frascos com álcool 70 para posterior análise por μ CT.

Avaliação Histológica Descritiva

Os cortes corados com H/E foram utilizados para análise histológica descritiva. Estas análises foram realizadas por um examinador cego e calibrado, com o auxílio de um microscópio de luz Leica DMLS na magnificação de 100

e/ou 200x. As áreas de interesse dos cortes pré-selecionados foram fotografadas com uma câmera digital Leica DFC 300 FX e as imagens capturadas arquivadas no formato TIFF (*Tagged Image File Format*).

A análise histológica descritiva englobou a área correspondente aos tecidos periodontais das raízes palatinas do primeiro molar superior, uma vez que as injeções eram realizadas nesta mesma região. Os aspectos observados foram: presença e caracterização de infiltrado inflamatório nas regiões sub-epitelial, próxima ao sulco gengival/bolsa periodontal, e supracrestal, acima da crista óssea alveolar classificada em grau leve (1), moderado (2) ou intenso (3). Também foi verificada a intensidade da presença de vasos sanguíneos e a presença de alguma outra alteração morfológica nos tecidos.

Extração de RNA Total, Transcrição Reversa e PCR em Tempo Real

Extração de RNA total

O RNA total dos tecidos coletados foi extraído com o kit RNAqueous-4PCR, segundo o protocolo do fabricante (Ambion, Inc).

O tecido gengival coletado foi macerado em 100 μ L de tampão de lise em tubo de 1,5mL com auxílio de pilão plástico fornecido com o kit. O mesmo volume (100 μ L) de etanol 64% foi adicionado ao tecido lisado e misturado cuidadosamente. Essa mistura foi transferida para um filtro e centrifugada a 15000g por 1 minuto. O filtrado foi descartado e o cartucho do filtro foi utilizado nos passos seguintes. Após 3 etapas de lavagem, o filtro foi transferido para um

novo tubo coletor e a solução de eluição (previamente aquecida a 70°C) pipetada no centro do filtro. Essa primeira alíquota foi de 40 µL. A solução obtida foi centrifugada por 30 segundos a 15000g, em temperatura ambiente. Uma segunda alíquota de 10 µL foi pipetada no centro do filtro e a solução novamente centrifugada por 30 segundos (essa segunda alíquota foi coletada no mesmo tubo da primeira).

A solução obtida foi misturada cuidadosamente e tratada com 1µL de DNase para cada amostra, incubada por 30 min a 37°C.

A DNase foi removida da preparação adicionando-se 5,6µL reagente de inativação da Dnase (quantidade igual a 10% do volume total da solução). O tubo foi agitado com cuidado (para dispersar o reagente) e incubado por 2min, sendo que, durante este tempo, foi agitado mais uma vez. Cada amostra foi centrifugada a 10000g por 1min para formar um pellet do reagente de inativação da DNase.

A quantidade e pureza do RNA foram determinadas em espectrofotômetro de luz UV (Biomate 3 - Thermo Electron Corporation) por meio da avaliação das absorbâncias a 260nm e da relação entre as absorbâncias a 260/280nm, respectivamente.

RT – Transcrição Reversa (síntese de cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada subsequentemente em termociclador (MyCycler - Bio-Rad), utilizando o kit TaqMan Reverse Transcription Reagents. Foram utilizados 400ng de RNA total por amostra na presença de água livre de nucleases, Oligo-dT, dNTPs, MgCl₂, inibidor de RNase e enzima de transcriptase

reversa, de acordo com o protocolo do fabricante (Applied Biosystems) nas seguintes condições de ciclagem: 25^oC por 10 minutos, 48^oC por 30 minutos e 95^oC por 5 minuto.

PCR em tempo real

Um microlitro do produto da reação de RT foi utilizado num volume total de reação de PCR de 20µL. Este volume incluiu, além do produto da reação de RT, 8µL água livre de nucleases, 10µL TaqMan gene expression master mix e 1µL TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems) para os genes alvo do camundongo (Tabela 1).

Tabela 1 - Primers e sondas inventoriadas TaqMan (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems)

Target Gene	Assay ID	Acession #	Amplicon Lenth (bp)
GAPDH	Mm 99999915 gl	NM_008084.2	107
IL -1 β	Mm 01336189_ml	NM_008361.3	63
TNF – α	Mm 00445258_ml	NM_013693.2	81
IL-6	Mm 00446190_ml	NM_031168.1	78
RANKL	Mm 00441906_ml	NM_011613.3	66
OPG	Mm01205928_ml	NM_008764.3	75

Os ensaios de expressão gênica incluem um par de “primers” para PCR não marcado e uma sonda marcada com fluoróforo (FAM-labelled), que deve anelar ao molde do amplicon dos “primers” específicos; todos estes ensaios são

pré-desenhados e otimizados pelo fabricante (Applied Biosystems) para detecção e quantificação de sequências de cDNA específicas dos genes-alvo. 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). Os níveis relativos da expressão dos genes foram calculados de acordo com as instruções da Applied Biosystems, utilizando a GAPDH como gene normalizador.

Os dados foram expressos usando o método de Ciclo limite (Ct ou Cycle threshold), ou seja, o número de ciclos no qual a curva logarítmica de PCR cruza uma linha de corte arbitrariamente calculada. Os valores foram normalizados subtraindo-se o Ct obtido da amplificação específica do gene alvo pelo Ct do gene normalizador (Δ Ct).

Microtomografia computadorizada – μ CT

Após o sacrifício dos animais, as hemimaxilas do lado direito foram removidas (N = 6 para cada grupo de 30 dias), fixadas em formol a 10% durante 24 horas e depois foram transferidas para uma solução de álcool 70% e armazenadas em temperatura ambiente. Os espécimes foram escaneados utilizando um sistema de microtomografia computadorizada (Skyscan 1174, Aartselaar, Belgium).

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 foi de 12 μ m; a magnificação da imagem foi de 10x; a voltagem do tubo de raios-X foi de 50 kV e o feixe foi de 496 uA e a corrente elétrica foi ajustada para 0.1mA. As imagens tridimensionais foram reconstruídas utilizando um software de reconstrução (NRecon 1.6.1.5 – SkyScan N. V. Belgium). Os parâmetros para reconstrução foram: Beam Hardening Correction 4%, Ring Artifact Correction =3, Smoothing =1, Postalignment =1.00.

Análise linear (2D): Para a realização da análise linear foi utilizado um software bidimensional (Data Viewer 1.4.3.1 - SkyScan, Belgium) para possibilitar a visualização e a quantificação da perda óssea alveolar em um computador. Todos os cortes escaneados foram reorientados em três planos, frontal, coronal e transaxial, antes de cada análise para alinhar uniformemente a posição anatômica, ou seja, mesial-distal, vestibular-palatina e medial e lateral (Figura 6). A medida da perda óssea alveolar foi determinada (em mm) a partir da junção cimento-esmalte (JEC) até a crista óssea alveolar (COA) na região distal da raiz disto-palatina do primeiro molar e na região mesial da raiz palatina do segundo molar (Figura 7A e B). 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.

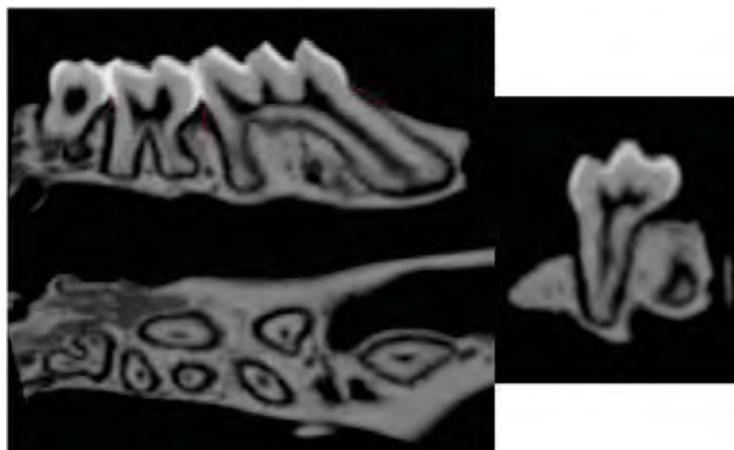


FIGURA 6 – Representação nos três planos (Frontal, Coronal e Transaxial) para padronização das medições antes de cada análise linear e volumétrica.



FIGURA 7 (A e B) – Representação esquemática da mensuração linear na face palatina das raízes distal do primeiro molar e mesial do segundo molar, para avaliação da distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar.

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. No caso dos defeitos periodontais resultados da doença periodontal experimental, a maior perda óssea alveolar foi notada na região interproximal entre o primeiro e segundo molar e na região palatina desses dentes em função dos métodos de indução (ligadura e injeção bacteriana).

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 segundo molar foi envolvida no ROI (Figura 8). Esta região foi escolhida por ser mais consistente entre os espécimes e pelo fato de que a colocação da ligadura e as injeções foram feitas nessa região. 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.



FIGURA 8 – Representação em um corte transaxial da área de interesse (ROI) delimitado a partir da raiz distal do segundo molar até a raiz mesial do primeiro molar, englobando o tecido ósseo da região interproximal e região de furca do segundo molar.

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, análise quantitativa dos componentes teciduais por estereometria e PCR em tempo real a análise estatística foi realizada utilizando-se o teste de análise de variância one-way Anova seguido de *post-test* de comparação múltipla Tukey's test.

RESULTADO

RESULTADO

Análise histológica descritiva

Grupo 1 – Controle negativo

Os cortes histológicos da raiz palatina do primeiro molar superior esquerdo dos camundongos do grupo controle, do período de 7 dias, apresentavam na região sub-epitelial, um infiltrado inflamatório leve com predomínio de linfócitos (80% dos casos) e neutrófilos e macrófagos (20% dos casos), vasos em grau leve (40% dos casos) ou moderado (60% dos casos). Na mucosa palatina observou-se epitélio sem alterações e sem infiltrado inflamatório em 80% dos casos. No conjuntivo supra-ósseo verificamos vasos normais sem infiltrado inflamatório. Nos animais controle negativo do período de 30 dias, observamos infiltrado inflamatório misto (80%) ou crônico (20%) com predomínio variado de células, por vezes linfócitos (20%), neutrófilos (20%), neutrófilos e macrófagos (20%) ou macrófagos (20%) e a presença de vasos foi classificada como leve. Na região de mucosa o quadro variou de normalidade, inflamação crônica a acantose com inflamação mista com predomínio de macrófagos ou linfócitos. No conjuntivo supra-ósseo verificamos normalidade (Figura 9A a D).

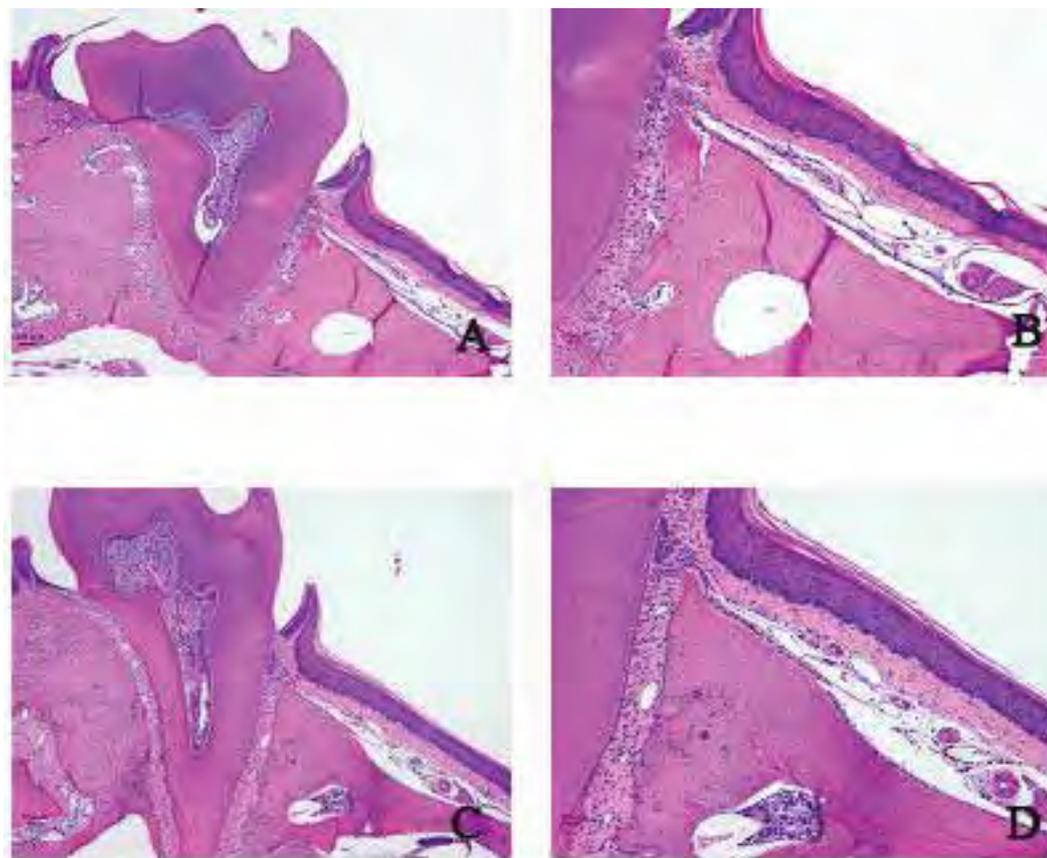


FIGURA 9 (A a D) – Fotomicrografia da região do primeiro molar superior esquerdo dos animais do grupo controle, dos períodos de 7 (A) e 30 dias (C). H&E. Aumento de 50x (B) e 100x D)

Grupo 2 – Ligadura

Os cortes histológicos do primeiro molar superior esquerdo dos camundongos submetidos à indução da doença periodontal no período de 7 dias, apresentavam-se com infiltrado inflamatório misto moderado com predomínio variado de células, por vezes neutrófilos (33%), neutrófilos e macrófagos (33%), linfócitos e macrófagos (33%) e vasos variando de leve (50%) a moderado (50%) na região sub-epitelial. Na mucosa palatina o quadro também variou, sendo observados acantose com infiltrado crônico (33%) ou misto (16%), apenas inflamação crônica com predomínio de neutrófilos e linfócitos ou macrófagos ou mesmo normalidade (16%). No conjuntivo supra-ósseo verificamos vasos normais sem infiltrado inflamatório (66%) ou infiltrado inflamatório crônico ou misto com predomínio de macrófagos ou mesmo macrófagos e neutrófilos. Os animais do período de 30 dias apresentaram-se com predomínio de células inflamatórias, neutrófilos e macrófagos, na região sub-epitelial. No tecido conjuntivo verificamos inflamação crônica moderada com predomínio de linfócitos e ausência de vasos (Figura 10A a D).

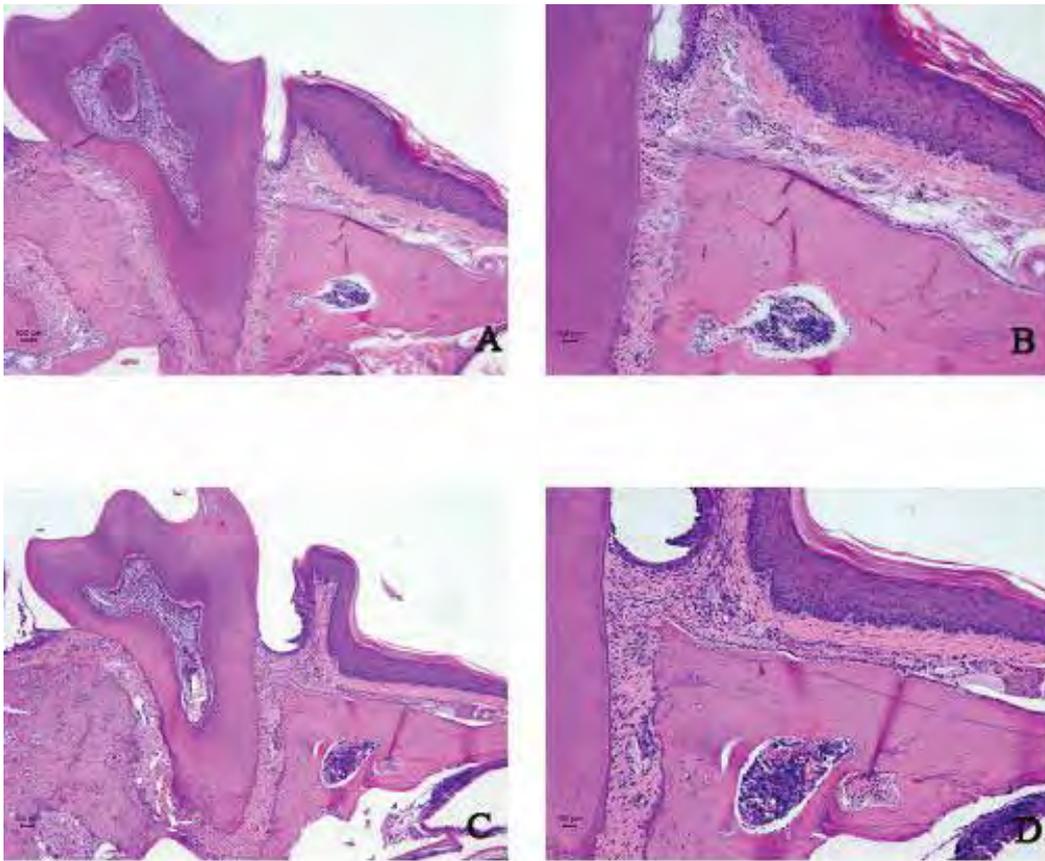


FIGURA 10 (A a D) – Fotomicrografia da região do primeiro molar superior esquerdo dos animais do grupo ligadura, dos períodos de 7(A) e 30(C) dias. H&E. Aumento de 50x (B) e 100x (D)

Grupo 3- Inoculação de Porphyromonas gingivalis

Os animais submetidos à indução de doença periodontal pelo método de inoculação bacteriana no período de 7 dias, apresentaram na região sub-epitelial, infiltrado inflamatório leve ou moderado, misto ou crônico com predomínio de neutrófilos (50%), macrófagos (25%) e neutrófilos e macrófagos (25%) e vasos classificados como grau leve. Na mucosa palatina observamos epitélio sem alterações (40%) ou acantose com infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos e macrófagos (60%). No conjuntivo observamos normalidade. No período de 30 dias, a região sub-epitelial apresentou-se com infiltrado inflamatório misto em grau moderado (80%) com predomínio de células inflamatórias: neutrófilos e linfócitos (80%). Na mucosa palatina observamos infiltrado inflamatório misto com acantose em 60% dos casos com predomínio de macrófagos e linfócitos e acantose isolada em 40% dos casos. No tecido conjuntivo, inflamação crônica moderada a intenso com macrófagos e linfócitos (Figura 11A a D).

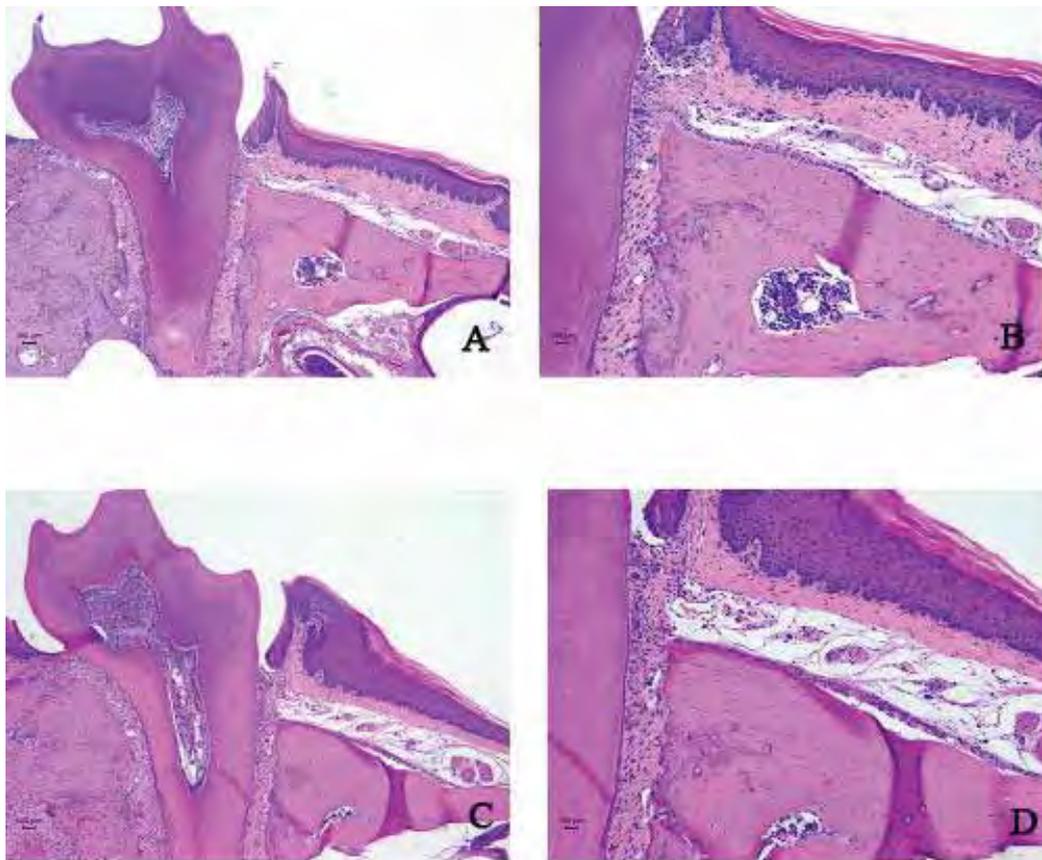


FIGURA 11 (A a D) – Fotomicrografia da região do primeiro molar superior esquerdo dos animais do grupo inoculação bacteriana, dos períodos de 7(A) e 30(C) dias. H&E. Aumento de 50x(B) e 100x(D)

Grupo 4 - Inoculação de Porphyromonas gingivalis + Fusobacterium nucleatum

Os animais submetidos à indução de doença periodontal pelo método de inoculação bacteriana no período de 7 dias, apresentaram na região subepitelial, infiltrado inflamatório misto (75%) ou crônico que demonstrou predomínio de neutrófilos (50%), neutrófilos e macrófagos (25%) ou somente macrófagos (25%). A formação de vasos foi classificada como leve. Na mucosa o quadro variou de ausência de alterações, apenas acantose e acantose e processo inflamatório crônico com predomínio de macrófagos em nível leve ou moderado. No conjuntivo o quadro foi de normalidade. No período de 30 dias os animais apresentaram-se com as mesmas características (Figura 12A a D).

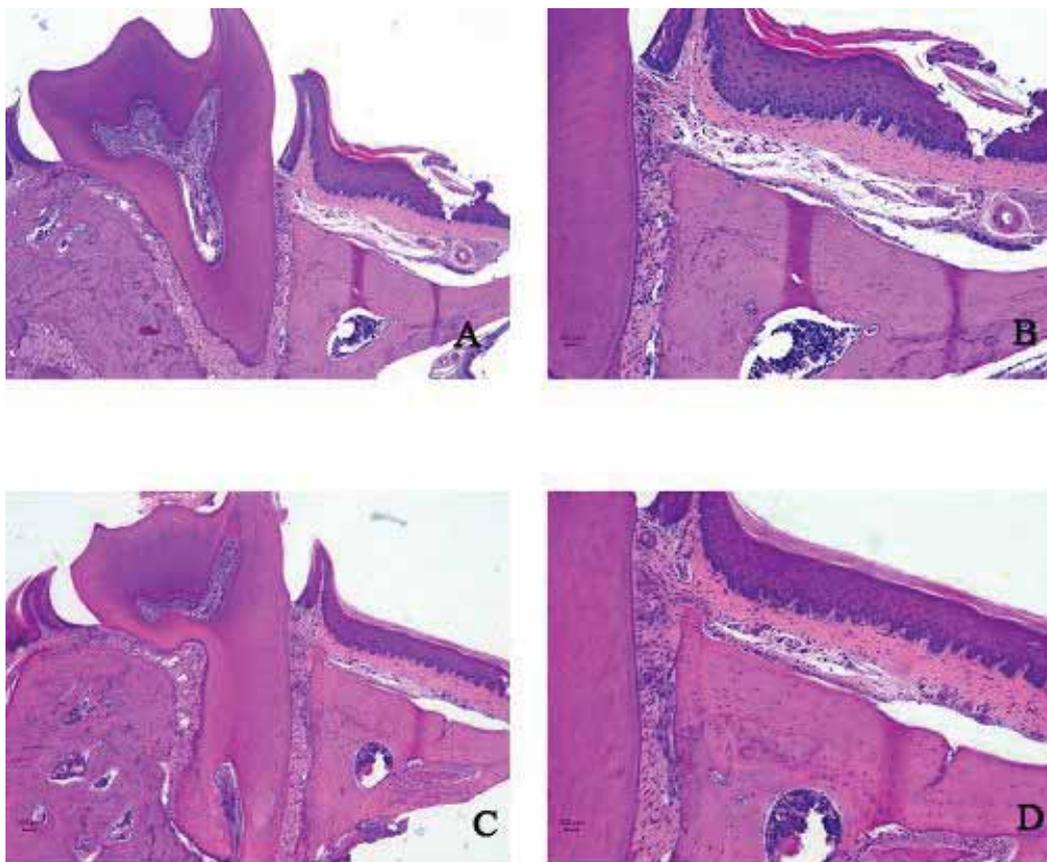


FIGURA 12 (A a D) – Fotomicrografia da região do primeiro molar superior esquerdo dos animais do grupo inoculação bacteriana, dos períodos de 7(A) e 30(C) dias. H&E. Aumento de 50x (B) e 100x (D)

Grupo 5 - Injeção de Porphyromonas gingivalis inativada por calor

Os animais submetidos à indução de doença periodontal pelo método de inoculação bacteriana no período de 7 dias, apresentaram na região sub-epitelial infiltrado inflamatório misto de leve (60%) a moderado (40%) com predomínio de neutrófilos associados a macrófagos ou linfócitos e vasos em grau leve (40%) ou moderado (60%). Na mucosa palatina observamos epitélio com acantose ou atrofia do epitélio com infiltrado inflamatório crônico leve e predomínio de macrófagos (40%) ou linfócitos (60%). No conjuntivo verificamos infiltrado inflamatório crônico de moderado (40%) a forte (60%) com predomínio de macrófagos. No período de 30 dias houve um agravamento do quadro, com infiltrado inflamatório intenso no tecido conjuntivo com predomínio de macrófagos e linfócitos (Figura 13A a D).

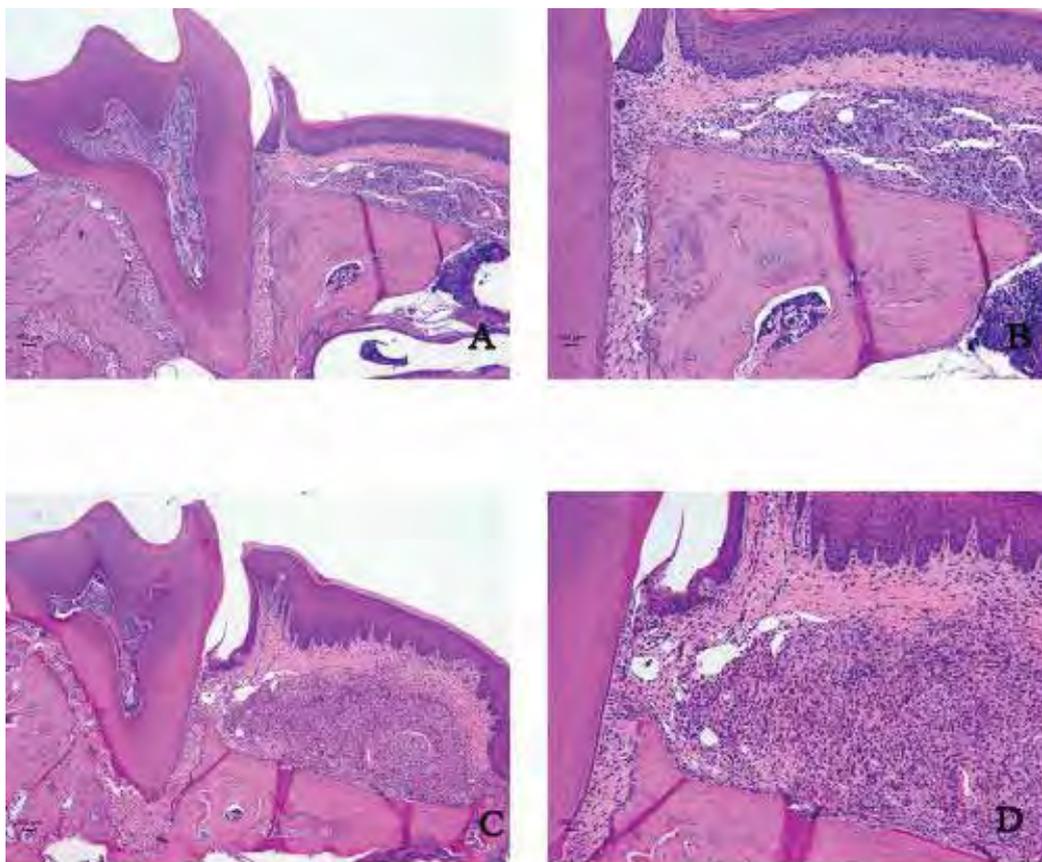


FIGURA 13 (A a D) – Fotomicrografia da região do primeiro molar superior esquerdo dos animais do grupo injeção de *Porphyromonas gingivalis* inativadas por calor , dos períodos de 7(A) e 30(C) dias. H&E. Aumento de 50x(B) e 100x(D)

A partir das análises histopatológicas realizadas, podemos identificar que na região de epitélio de sulco, nenhum grupo apresentou infiltrado inflamatório intenso e somente o grupo “ligadura” demonstrou infiltrado inflamatório moderado. Outro aspecto interessante foi à observação de que apenas o controle negativo apresentou infiltrado inflamatório predominantemente crônico. Adicionalmente, verificamos que todos os grupos demonstraram-se semelhantes em relação à distribuição de vasos nesta região, exceto o grupo gavagem de “*Porphyromonas gingivalis* + *Fusobacterium nucleatum*” que demonstraram nível leve.

Na análise da mucosa lingual observamos normalidade no grupo controle, mas atrofia e acantose no grupo injeção de *Porphyromonas gingivalis* inativadas por calor e no grupo ligadura e infiltrado inflamatório crônico. Já os grupos de gavagem demonstraram padrão variável com 40% dos casos de normalidade e 60% demonstrando infiltrado inflamatório crônico com evidente acantose do epitélio.

O tecido conjuntivo justaposto ao osso da região palatina foi analisado em separado e foi possível observar que o grupo *Porphyromonas gingivalis* inativadas por calor demonstrou infiltrado inflamatório crônico em grau moderado a forte com evidente predomínio de macrófagos. Este mesmo grupo apresentou maiores quantidades de vasos nesta região.

Análise histológica descritiva

Com as amostras obtidas dos cortes histológicos de 6 animais, dos períodos de 7 e 30 dias, de todos os grupos, foram feitas as análises para quantificação do processo inflamatório e do número de vasos presentes, e estão representados nas Figuras 14 e 15 abaixo. Os resultados foram submetidos ao teste paramétrico *One-way* ANOVA complementado pelo teste de Tukey para avaliar a diferença entre os grupos, nos períodos de 7 e 30 dias de indução da doença periodontal.

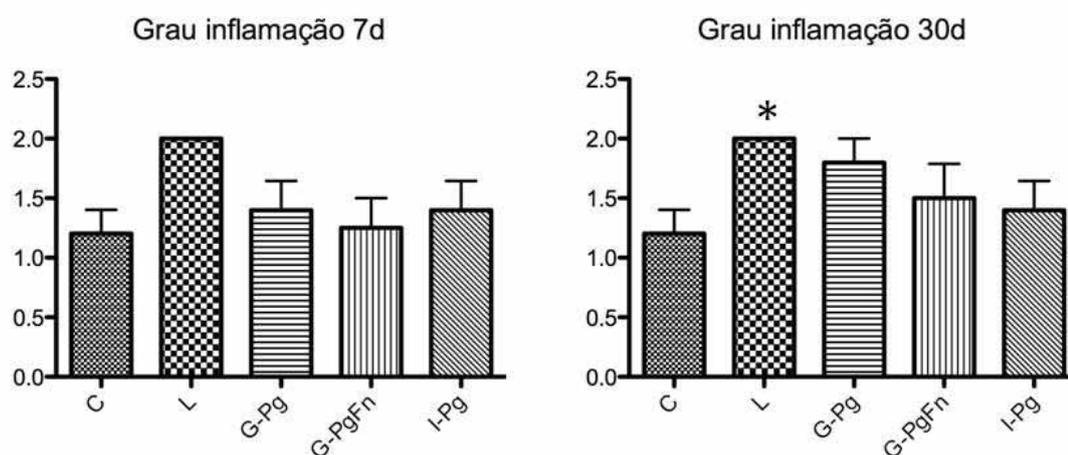


FIGURA 14 - *Indica diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo C. ANOVA ($p < 0.05$)

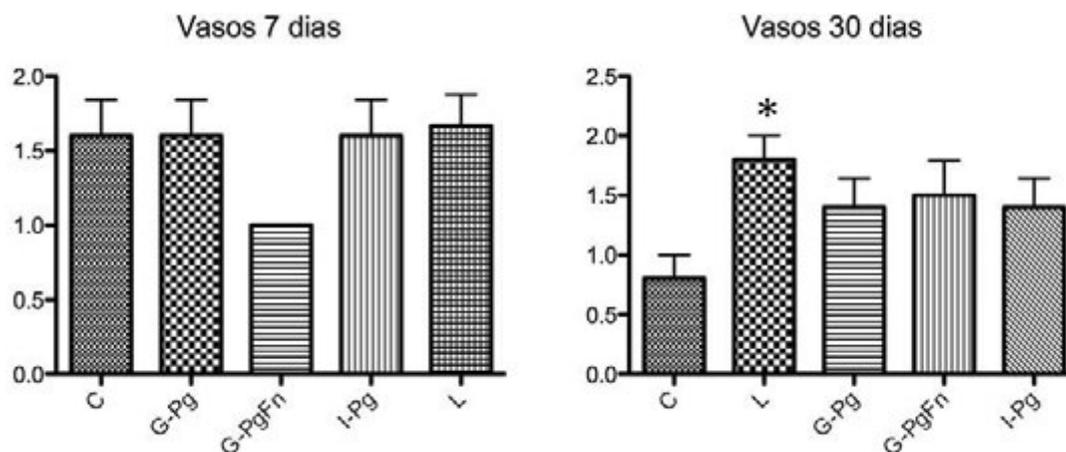


FIGURA 15 - *Indica diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo C. ANOVA ($p < 0.05$)

Microtomografia Computadorizada - μ CT

Imagens tridimensionais geradas a partir dos cortes tomográficos, revelaram uma clara redução do osso alveolar no grupo 2 (ligadura) e no grupo 5 (injeção de *Porphyromonas gingivalis*), na área interproximal ente o primeiro e o segundo molar no período de 30 dias, comparados com os demais grupos.

Análise Linear

A análise linear mostrou que no grupo 2 e no grupo 5 houve um aumento na perda óssea alveolar em altura (distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar), nas faces distal da raiz disto-palatina do primeiro molar e na região mesial da raiz palatina do segundo molar. Análises intergrupos revelou

que, comparado com os grupos controle e inoculação (Grupos 1, 3 e 4) a colocação de ligadura e a injeção de *Porphyromonas gingivalis* na região palatina, resultou em aumento da perda óssea alveolar no período de 30 dias ($p < 0.05$) (Figura 16)

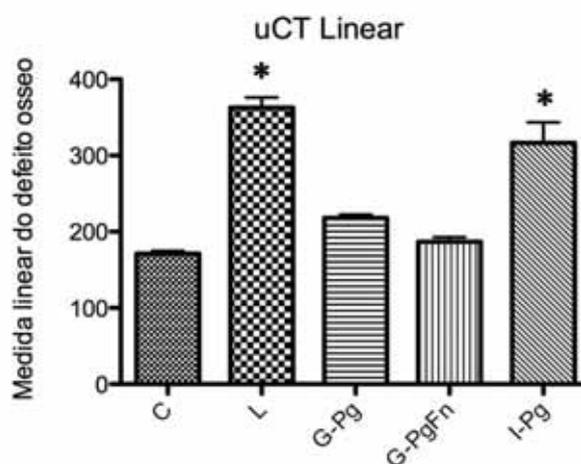


FIGURA 16 – Medida linear do defeito ósseo nos diferentes grupos experimentais do período de 30 dias.

* Indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos C, G-Pg e G-PgFn. ANOVA, ($p < 0.05$)

& Indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos C, G-Pg, e G-PgFn. ANOVA ($p < 0.05$)

Análise Tridimensional Volumétrica

Os resultados da análise volumétrica demonstraram que a instalação da ligadura e a injeção de bactérias na região de mucosa palatina na região

interproximal, resultaram em redução estatisticamente significativa do volume ósseo presente na região de interesse (ROI), comparado com os demais grupos e representados por fotomicrografia e reconstrução tridimensional ($p < 0.05$) (Figuras 17 a 23).

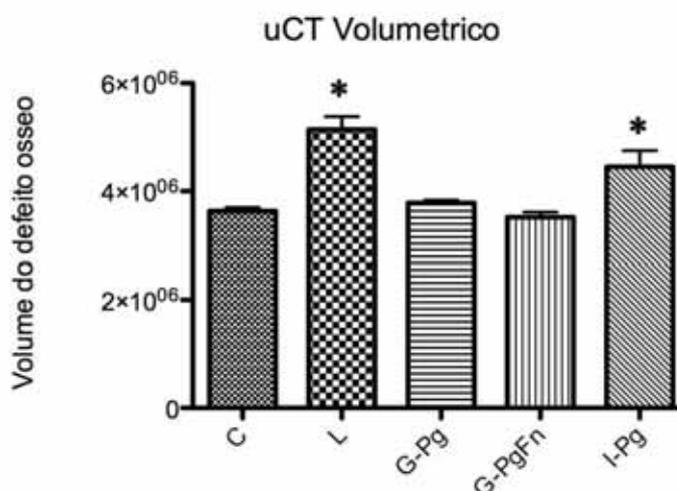


FIGURA 17 – Volume do defeito ósseo entre os diferentes grupos experimentais do período de 30 dias. As barras nos gráficos indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão de 6 amostras de todos os grupos.

* Indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos C, G-Pg, e G-PgFn. ANOVA, ($p < 0.05$) & Indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos C, G-PgFn. ANOVA, ($p < 0.05$).



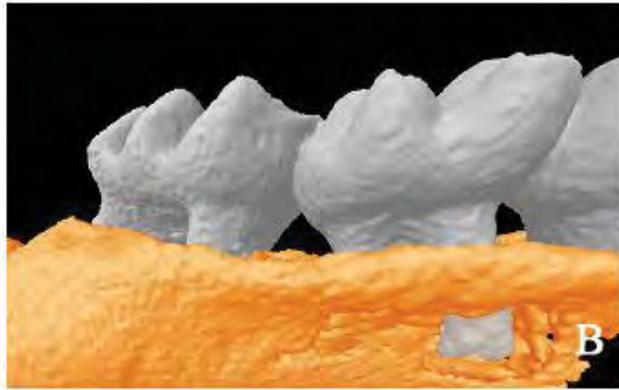
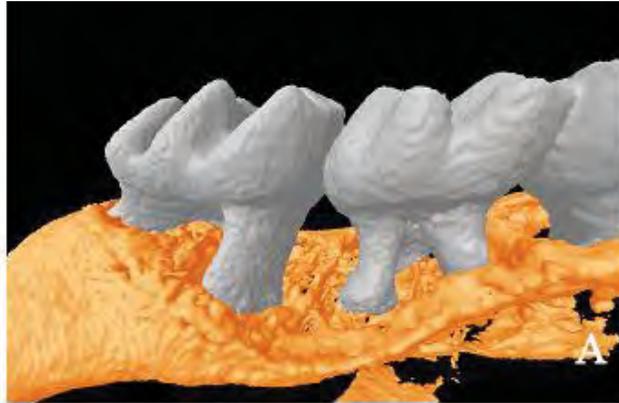
FIGURA 18 – Fotomicrografia das raízes palatinas do primeiro e segundo molar superior no grupo injeção bacteriana. É possível notar (seta) evidente perda óssea na região interproximal, estatisticamente significante com relação ao grupo controle.



FIGURA 19 - Fotomicrografia do grupo ligadura evidenciando (seta) aumento da perda óssea alveolar na região interproximal, entre o primeiro e o segundo molar, estatisticamente significante em relação aos demais grupos.



FIGURA 20 – Fotomicrografia do grupo



FIGURAS 21 a 23 - Reconstrução tridimensional volumétrica dos grupos L (A), I-Pg (B) e C (C), respectivamente, na região palatina.

RT-PCR em Tempo Real

Com as amostras obtidas de 6 animais de cada grupo do período de 7 e 15 dias, foi feita a quantificação da expressão de RNAm dos mediadores envolvidos na osteoclastogênese RANKL e OPG, e das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 durante a evolução da doença periodontal induzida experimentalmente pelos métodos de ligadura, gavagem e injeção bacteriana utilizando PCR em tempo real. Os dados obtidos das médias das duplicatas de cada amostra foram normalizadas para níveis de expressão de GAPDH e expressos como “*fold-change*” em relação aos níveis nos animais sem indução da doença (controles). Os resultados foram submetidos ao teste paramétrico *One-way ANOVA* complementados pelo teste de Tukey e estão apresentados nas figuras abaixo (Figuras 24 a 28).

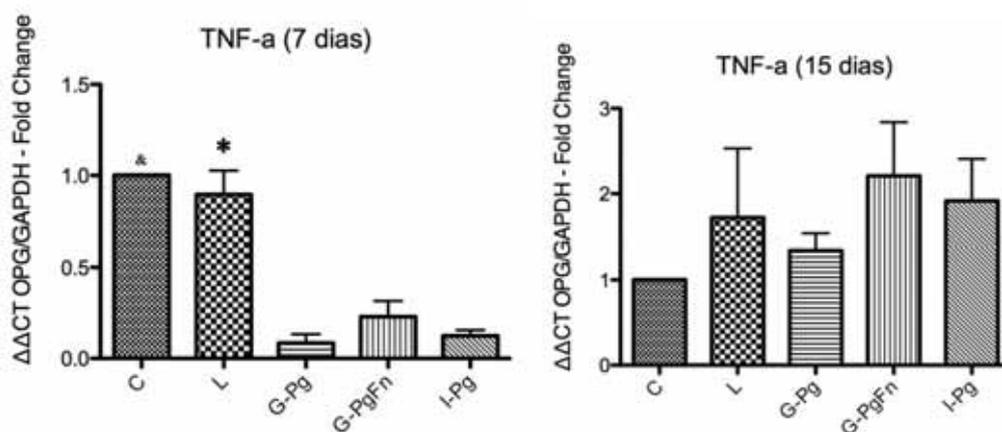


FIGURA 24 - *Fold-change* (Média e desvio-padrão) da expressão de TNF- α , nos diferentes grupos de tratamento nos períodos de 7 e 15 dias. *Indica diferença estatisticamente significativa com relação aos grupos G-Pg, G-PgFn e I-Pg. &Indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos G-Pg, G-PgFn e I-Pg ANOVA e Tukey's test ($p < 0.05$).

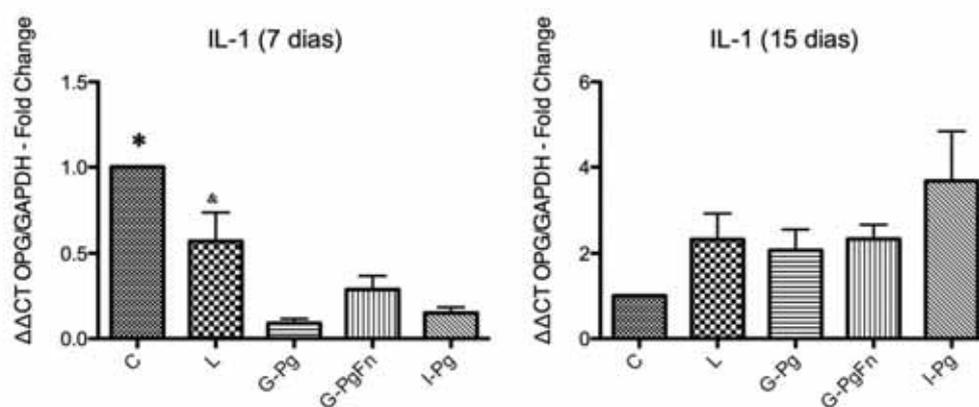


FIGURA 25 - *Fold-change* (Média e desvio-padrão) da expressão de IL-1 β , nos diferentes grupos de tratamento nos períodos de 7 e 15 dias. *Indica diferença estatisticamente significativa com relação aos grupos L, G-Pg, G-PgFn e I-Pg. &Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo G-Pg e I-Pg ANOVA e Tukey's test ($p < 0.05$).

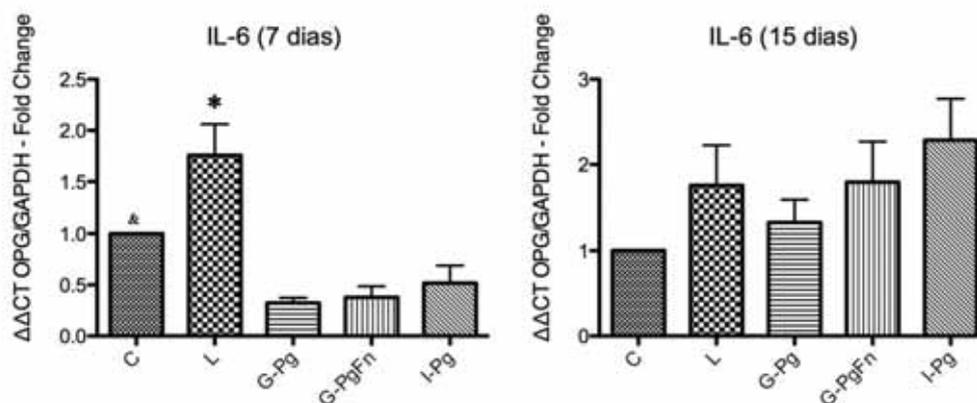


FIGURA 26 - *Fold-change* (Média e desvio-padrão) da expressão de IL-6, nos diferentes grupos de tratamento nos períodos de 7 e 15 dias. *Indica diferença estatisticamente significativa com relação aos grupos C, G-Pg, G-PgFn e I-Pg. &Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo G-Pg, G-PgFn ANOVA e Tukey's test ($p < 0.05$).

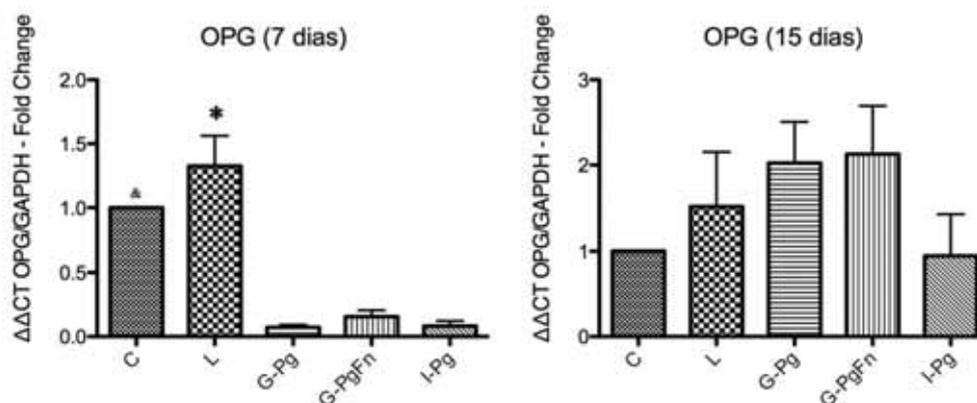


FIGURA 27 - *Fold-change* (Média e desvio-padrão) da expressão de OPG, nos diferentes grupos de tratamento nos períodos de 7 e 15 dias. *Indica diferença estatisticamente significativa com relação aos grupos G-Pg, G-PgFn e I-Pg.

&Indica diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos G-Pg, G-PgFn e I-Pg ANOVA e Tukey's test ($p < 0.05$).

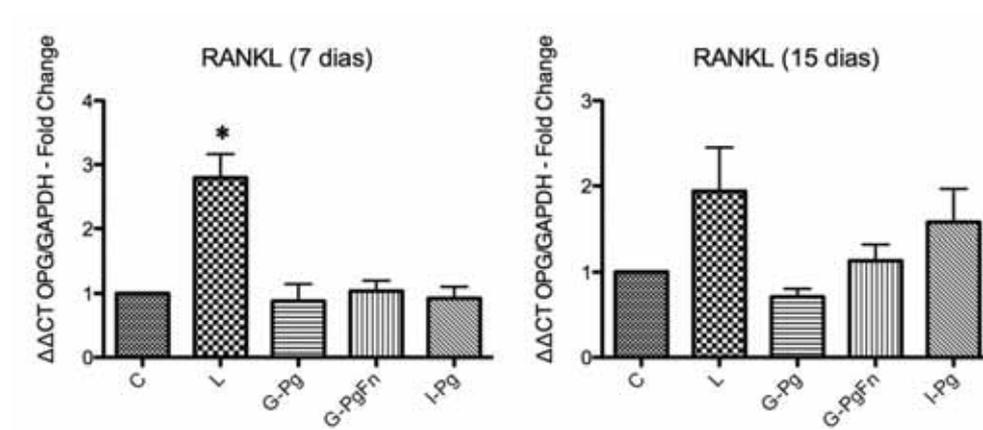


FIGURA 28 -*Fold-change* (Média e desvio-padrão) da expressão de RANKL, nos diferentes grupos de tratamento nos períodos de 7 e 15 dias. *Indica diferença estatisticamente significativa com relação aos grupos C, G-Pg, G-PgFn e I-Pg. ANOVA e Tukey's test ($p < 0.05$).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Modelos animais de indução de doença periodontal experimental têm contribuído para novos conhecimentos dentro da ciência biológica. Estes permitem a reprodução das complexas respostas do hospedeiro que ocorrem durante a patogênese da doença periodontal⁶⁴. Embora os modelos animais não reproduzam tudo o que ocorre nos humanos, eles permitem avaliar a doença longitudinalmente e a um nível celular e molecular. Portanto, a utilização de modelos animais para investigação sobre a resposta do hospedeiro torna-se criticamente importante no estudo da doença periodontal e para o desenvolvimento de novos tratamentos. Vários são os modelos descritos na literatura, dentre os mais utilizados destacam-se: gavagem oral por meio de inoculação de cepas de bactérias vivas na cavidade oral, colocação de ligadura e injeção bacteriana.

O modelo de gavagem oral tem sido avaliado em diferentes linhagens e espécies de animais, principalmente em camundongos e ratos, e têm sido utilizadas diversas cepas bacterianas. O periodonto é um conjunto de tecidos que fica exposto à cavidade oral. Aproximadamente 700 espécies bacterianas estão presentes em amostras de placa subgingival e estão associadas ao início e progressão da doença periodontal. Contudo, ainda há controvérsias sobre qual bactéria inicia os eventos que levam à ruptura irreversível dos tecidos periodontais. Considerada atenção tem sido dada a *Porphyromonas gingivalis*, anaeróbico gram negativo, membro do complexo vermelho⁸⁰. *P. gingivalis* expressa uma variedade de fatores de virulência que incluem fímbrias, adesinas,

polissacarídeo capsular, lipopolissacarídeo e várias enzimas proteolíticas responsáveis por causarem a inflamação crônica do periodonto⁴². Embora estes fatores de virulência sejam importantes para o crescimento e sobrevivência da *P. gingivalis*, alguns destes também auxiliam na patogênese de outros microrganismos orais. Este microrganismo é conhecido como sendo um dos mais periodontopatogênicos, visto que possui a capacidade de co-agregar com colonizadores pioneiros, tais como *Streptococcus mitis* e *Streptococcus oralis* e com colonizadores intermediários, como *Fusobacterium nucleatum*⁵³. O *F. nucleatum* é conhecido por promover, inicialmente, a adesão aos primeiros colonizadores, incluindo cocos gram-positivos, e aumentar a aderência de bactérias periodontopatogênicas como a *P. gingivalis* e *T. denticola* em lesões periodontais⁵². No estudo de Saito et al.⁷³ (2008), os autores mostraram o forte efeito sinérgico entre *P. gingivalis* e *F. nucleatum*, e observaram maior crescimento da primeira na presença da segunda. Em um estudo recente utilizando modelo de gavagem oral induzido pela inoculação de *P. gingivalis* associado com *F. nucleatum*, em camundongos BALB/c os autores mostraram que a infecção mista foi mais destrutiva do que a infecção utilizando somente uma destas cepas bacterianas. Os animais infectados com *P. gingivalis* ou com *F. nucleatum* isoladamente, não apresentaram perda óssea alveolar significativa, se portando de maneira similar aos animais do grupo controle⁶⁸. Por outro lado, Kesavalu et al.⁴⁷ (2007), realizou um estudo em ratos Sprague-Dawley, utilizando este mesmo modelo, e observou que apesar de a infecção mista com *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* e *F. nucleatum*, induzir grande perda óssea alveolar, quando

comparados com mono-infecções, na exclusão do *F. nucleatum*, não houve diferença significativa na destruição óssea avaliada⁴⁷. Este resultado sugere que a cepa utilizada influencia diretamente na presença ou ausência de sinergismo entre estes microrganismos. Nossas constatações estão de acordo com o trabalho acima onde a presença do *F. nucleatum* não agravou a perda óssea alveolar quando associado a *P. gingivalis*. A limitada perda óssea observada nos grupos *P. gingivalis* ou *P. gingivalis* + *F. nucleatum* foram muito semelhantes com o grupo controle, ou seja, não houve diferença estatisticamente significante entre esses grupos, identificados por meio de análise histológica e uCT. O efeito comensal entre ambos os microrganismos e a relação direta com a periodontite justifica a utilização da *P. gingivalis* e *F. nucleatum* em nossa pesquisa.

Ao mesmo tempo em que não houve diferença entre os grupos na presença do *F. nucleatum*, o modelo de gavagem oral, da forma como foi realizado, não foi efetivo para induzir a doença periodontal. Estes resultados negativos podem ser justificados pela baixa concentração dos microrganismos, linhagem dos camundongos, período experimental e a cepa utilizada. Embora a *P. gingivalis* tenha sido indicada como indutora da doença periodontal em modelos experimentais, a cepa utilizada (ATCC 52977, 381 e W50) nos estudos prévios^{4,86}, são mais agressivas do que a utilizada em nosso estudo (ATCC 33277), além disso, a concentração bacteriana utilizada nos estudos de Baker et al.⁴ (1994) e Wilensk et al.⁸⁶ (2005), foi dez vezes superior a utilizada no estudo em questão. Além disso, segundo Baker et al.⁵ (2000) esta linhagem de camundongos C57BL/6 jovens são mais resistentes a indução experimental da doença

periodontal, diferentemente dos camundongos BALB/c utilizados em estudos anteriores. Estes mesmos autores avaliaram a suscetibilidade genética entre diversas linhagens de camundongos em induzir doença periodontal experimental. Para isto, foi utilizado um modelo de gavagem com cepas humanas de *P. gingivalis*. Os resultados mostraram perda óssea alveolar nas linhagens dos camundongos AKR/J, DBA/2J e BALB/c e ausência de perda óssea nas linhagens A/J, A/HeJ, SJL/J e C57BL/6⁵. Nossos resultados são semelhantes aos achados acima, onde a indução da doença periodontal pelo método de gavagem, por meio de mono-infecção (*P. gingivalis*) ou poli-infecção (*P. gingivalis* + *F. nucleatum*) em camundongos C57BL/6, não mostrou diferença estatisticamente significativa em relação à perda óssea alveolar quando comparadas com o grupo controle, medidas a partir da JCE à COA. Por outro lado, os estudos de Yoneda et al.⁸⁸ (2001), que avaliaram a suscetibilidade de varias linhagens de camundongos, contra a infecção por *P. gingivalis* (ATCC 33277) em um modelo de abscesso subcutâneo, demonstrou resultados inconsistentes com os achados acima. Os autores mostraram que as linhagens BALB/c, CD-1 e C57BL/6 foram mais suscetíveis quando comparados com DBA/1J, C3H/HeN e C3H/HeJ, avaliados pela formação de abscesso e condições gerais dos animais⁸⁸. Por conseguinte, o período experimental de 30 dias, pode ter contribuído para ausência de perda óssea, uma vez que a literatura apresenta trabalhos utilizando períodos experimentais mais longos, para permitir uma maior proliferação dos microrganismos na cavidade oral dos animais^{47,68}. Uma das limitações do nosso estudo foi a não realização de exames para comprovar a colonização bacteriana na

cavidade oral dos animais. Exames moleculares como PCR e o método imunoenzimático – ELISA, poderiam fornecer informações importantes como colonização ou não das bactérias e presença no soro, de anticorpo - IgG contra *P. gingivalis* e *F. nucleatum*.

Não obstante, o modelo de ligadura foi efetivamente utilizado para induzir reabsorção óssea alveolar nos camundongos C57BL/6, no período de 30 dias, comprovado por meio de uCT. Nossos resultados mostram nos cortes histológicos, migração apical do epitélio juncional e inflamação. Perda dos tecidos de suporte, especialmente na área interproximal entre o primeiro e segundo molar, foram observados nos cortes histológicos e nas medidas obtidas por μ CT que está em concordância com diversos estudos na literatura que utilizaram o mesmo método^{81,56,60,61,89}. O princípio da utilização deste modelo esta baseado na aderência de microrganismos ao redor da ligadura, que serve como um nicho para a colonização bacteriana que iniciaria a lesão periodontal⁵¹. Para isso, é colocado ao redor da cervical dos molares superiores, um fio de seda multifilamentado para facilitar o acúmulo de placa. No nosso estudo, foi utilizado um fio de nylon, monofilamentado, pelo fato de que os fios de seda, utilizados previamente no estudo piloto, não permaneceram em posição durante os 30 dias de período experimental. Geralmente os fios de seda acumulam mais microrganismos, e conseqüentemente mais inflamação, mas são menos resistentes à mastigação por longos períodos de tempo, principalmente quando em espessura muito fina (6-0).

Alguns autores consideram este modelo, como sendo o mais representativo da periodontite em humanos⁸¹. As desvantagens do modelo de ligadura estão

relacionadas com o trauma mecânico causado durante a colocação da ligadura e com a diminuição da severidade da doença com o passar do tempo. Isso pode ser atribuído a uma característica protetora dos tecidos periodontais, atribuído a uma característica protetora dos tecidos periodontais. Frente a uma destruição do osso alveolar, os tecidos tendem a migrar no sentido apical em uma tentativa de recuperar o espaço biológico, como corroborado por nosso grupo de pesquisa^{1-81,25}. Para que a intensidade da indução da doença seja mantida com o passar do tempo, alguns autores^{60,89} utilizam ligadura incubadas com *P. gingivalis*, e reposicionam diariamente o fio na posição apical para manter íntimo contato com os tecidos marginais, evitando um maior distanciamento entre os tecidos periodontais e o agente agressor, e com suficiente carga microbiana.

Em nosso estudo, apesar da ligadura ter sido de nylon e de não ter sido reposicionada, diariamente, ao redor do dente, os resultados se apresentaram com evidente perda de inserção óssea, em concordância com os trabalhos descritos acima. Apesar do modelo de ligadura ser um modelo agudo de doença periodontal, onde a perda óssea ocorre primariamente nos primeiros 7 a 15 dias⁴⁴, em nossos resultados, significativa perda óssea alveolar ocorreu no período mais longo de 30 dias. A característica do fio de nylon pode ter contribuído para o atraso da doença periodontal uma vez que dificulta a adesão de microrganismos sobre eles, associado ao baixo trauma mecânico durante a colocação da ligadura e a característica de resistência a doença da linhagem de camundongo utilizada.

A indução de doença periodontal experimental por meio de injeções, de LPS bacteriano ou de bactérias inativadas, na mucosa palatina maxilar tem sido

amplamente utilizada para avaliação de expressão gênica e para indução de reabsorção óssea em modelos animais^{35,36,73,81,84}. Diferentemente do modelo de ligadura que permite o acúmulo de microrganismos viáveis e naturalmente presentes na espécie animal, o modelo de injeção bacteriana não é iniciado pela resposta do hospedeiro ao biofilme subgingival. Os resultados histológicos e do μ CT demonstram neste modelo, resultados semelhantes a periodontite humana, principalmente na região onde eram realizadas as injeções, na região palatina entre os molares, caracterizado por reabsorção óssea alveolar.

No presente estudo, para evidenciar o caráter inflamatório, a nível molecular, tanto nos diferentes modelos de indução de doença periodontal quanto nos diferentes períodos envolvidos, foram avaliados o RNAm de diferentes citocinas pró-inflamatórias e de moléculas envolvidas com a osteoclastogênese. Os modelos de injeção bacteriana e de ligadura foram os mais representativos da doença periodontal experimental, caracterizado por um aumento da intensidade do processo inflamatório, aumento no nível de expressão dos mediadores pró-inflamatórios e perda óssea evidenciada através de μ CT.

Em nossos resultados foi observado que no modelo de ligadura a expressão dos mediadores da osteoclastogênese RANKL e OPG e das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF- α foi mais acentuada aos 7 dias de indução da doença com conseqüente diminuição no período de 15 dias. Esses resultados estão de acordo com a literatura científica^{1,25,81}, onde o modelo de ligadura é caracterizado nos períodos iniciais (7 dias), por intensa reabsorção óssea e

aumento da expressão de RNAm e com o passar dos dias, ocorre uma conseqüente diminuição da expressão de RNAm dos mediadores e da perda óssea alveolar.

Ainda com relação à expressão de RNAm dos mediadores inflamatórios, no modelo de injeção de *P. gingivalis* inativadas por calor, é interessante observar que o pico de expressão de todos os mediadores analisados – RANKL, OPG, IL-1, IL-6 e TNF- α , bem como a intensidade da inflamação, ocorreu aos 15 dias de indução e se mantiveram elevadas em relação ao grupo controle. Esses resultados podem ser justificados devido às repetidas injeções de bactérias, realizadas 3x por semana durante toda a duração do experimento, o que mantinham a intensidade da agressão no local. Da mesma forma, nos grupos de gavagem oral seja com mono-infecção com *P. gingivalis* ou por poli-infecção com *P. gingivalis* + *F. nucleatum*, os resultados mostram, assim como no grupo de injeção bacteriana, que ocorre um aumento significativo da expressão desses mediadores pró-inflamatórias conforme aumenta o período experimental. Sendo assim, é possível que o tempo influencie, diretamente, o aumento da colonização, a aderência e multiplicação bacteriana dentro da cavidade oral dos animais. Um maior período de tempo entre as inoculações bacterianas e o sacrifício dos animais (45-60 dias) poderia confirmar a veracidade desta relação.

Os resultados observados no presente estudo sugerem que os modelos de indução de doença periodontal experimental, em camundongos C57BL/6, por meio de ligadura e injeções bacterianas na mucosa palatina, são os modelos mais representativos da doença periodontal em humanos. Sendo que estes modelos podem fornecer bases para futuros estudos intervencionais, que contribuem para o

entendimento da patogênese da doença e da complexa resposta do hospedeiro frente ao desafio microbiano. Além disso, podem tornar possível a validação de hipóteses e provar a eficácia de novas terapias para o controle da doença periodontal em humanos.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Modelos de indução de doença periodontal experimental em roedores são úteis, pois fornecem uma grande quantidade de informações sobre a patogênese da doença periodontal. Em nosso estudo, podemos concluir que, os modelos de ligadura e injeção bacteriana foram os mais representativos da doença periodontal em humanos, evidenciado por meio de significativa perda óssea alveolar, em ambos os grupos, e aumento da expressão da citocina pró-inflamatória IL-6 e do mediador da osteoclastogênese RANKL, no grupo ligadura, em relação aos demais grupos. 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

REFERÊNCIAS*

1. 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;54:609-17.
2. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol.* 1998;160:403-9.
3. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 2002;115:3719-27.
4. Baker PJ, Evans RT, Roopenian DC. Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and induced alveolar bone loss in immunocompetent and severe combined immunodeficient mice. *Arch Oral Biol.* 1994;39:1035-40.
5. Baker PJ, Dixon M, Roopenian DC. Genetic control of susceptibility to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in mice. *Infect Immun.* 2000;68:5864-8.
6. Baker PJ, Boutaugh NR, Tiffany M, Roopenian DC. B cell IgD deletion prevents alveolar bone loss following murine oral infection. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2009;2009:864359

* De acordo com o estilo Vancouver.

Disponível no site http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

7. 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;67:2804-09.
8. Baumgartner JC, Falkler WA Jr, Beckerman T. Experimentally induced infection by oral anaerobic microorganisms in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol.* 1992;7:253-6.
9. Bezerra MM, Brito GA, Ribeiro RA, Rocha FA. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35:613-6.
10. Bronstein-Sitton N, Cohen-Daniel L, Vaknin I, Ezernitchi AV, Leshem B, Halabi A, et al. Sustained exposure to bacterial antigen induces interferon-gamma-dependent T cell receptor zeta down-regulation and impaired T cell function. *Nat Immunol.* 2003;4:957-64.
11. Callard R, George AJ, Stark J. Cytokines, chaos, and complexity [review]. *Immunity.* 1999;11:507-13.
12. Cesar Neto JB, de Souza AP, Barbieri D, Moreno H Jr, Sallum EA, Nociti FH. Matrix metalloproteinase-2 may be involved with increased bone loss associated with experimental periodontitis and smoking:a study in rats. *J Periodontol.* 2004;75:995–1000.
13. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol.* 2008;79:1569-76.

14. Delima AJ, Oates T, Assuma R, Schwartz Z, Cochran D, Amar S, et al. Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) Inhibit loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001;28:233-240.
15. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease [review]. *Blood.* 1996;87:2095-147.
16. Duarte PM, Tezolin KR, Figueiredo LC, Feres M, Bastos MF. Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 2010;55:142-7.
17. 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 innervations. *J Clin Periodontol.* 2004;31:596-603.
18. 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;23:23-32.
19. Ejeil AL, Gaultier F, Igondjo-Tchen S, Senni K, Pellat B, Godeau G, et al. Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression? *J Periodontol.* 2003;74:196-201

20. Eskan MA, Rose BG, Benakanakere MR, Zeng Q, Fujioka D, Martin MH, et al. TLR4 and S1P receptors cooperate to enhance inflammatory cytokine production in human gingival epithelial cells. *Eur J Immunol.* 2008;38:1138-47.
21. 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;36:739-49.
22. Ferreira LM, Ferreira LRK. Experimental model: historic and conceptual revision. *Acta Cir Bras.* 2003;18:1-3.
23. 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;64:2094-100.
24. 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;27:609-14.
25. 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;84:745-54.
26. Garlet GP, Martins W Jr, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2003;38:210-7.

27. Garlet GP, Avila-Campos MJ, Milanezi CM, Ferreira BR, Silva JS. Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. *Microbes Infect* 2005;7:738-47.
28. 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;21:12-20.
29. Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, et al. The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clin Exp Immunol*. 2007;147:128-138.
30. Genco RJ, Grossi SG, Ho A, Nishimura F, Murayama Y. A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. *J Periodontol*. 2005;76:2075-84.
31. Gilbert AD, Sofaer JA. Host genotype, pathogenic challenge and periodontal bone loss in the mouse. *Arch Oral Biol*. 1988;33:855-61.
32. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003;74:391-401.

33. Graves DT, Liu R, Oates TW. Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis: impact on periodontal pathosis. *Periodontol 2000*. 2007;45:128-37.
34. 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;35:89-105.
35. Guimarães MR, Coimbra LS, de Aquino SG, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa C Jr. Potent anti-inflammatory effects of systemically administered curcumin modulate periodontal disease in vivo. *J Periodontal Res*. 2011;46:269-79.
36. Guimarães MR, de Aquino SG, Coimbra LS, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa C Jr. Curcumin modulates the immune response associated with LPS-induced periodontal disease in rats. *Innate Immun*. 2012;18:155-63.
37. Györfi A, Fazekas A, Suba Z, Ender F, Rosivall L. Neurogenic component in ligature-induced periodontitis in the rat. *J Clin Periodontol*. 1994;21:601-5.
38. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal disease. *Periodontol 2000*. 1994;5:78-111.
39. 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;23:3148-56.

40. Hochman B, Ferreira LM, Vilas Bôas FC, Mariano M. Experimental model in hamsters (*Mesocricetus auratus*) to study heterologous graft of scars and cutaneous diseases in plastic surgery. *Acta Cir Bras.* 2005;20:200-12.
41. Hoffman MM, Schour I. Quantitative studies in the development of the rat molar. II. Alveolar bone, cementum and eruption. *Am J Orthod.* 1940;26:854-74.
42. Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000.* 2005;38:72-122.
43. Jiang Y, Mehta CK, Hsu TY, Alsulaimani FF. Bacteria induce osteoclastogenesis via an osteoblast-independent pathway. *Infect Immun.* 2002;70:3143-48.
44. 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;69:34-40.
45. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation [review]. *Oral Dis.* 2002;8:147-59.
46. Kenworthy R, Baverel M. Studies of a periodontal tissue lesion in the rat, untreated or treated with chlorhexidine digluconate. *J Clin Periodontol.* 1981; 8:349-58.

47. 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;75:1704-12.
48. 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;71:1167-73.
49. Kinane DF, Attström 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;32:130-1.
50. Kirkwood KL, Cirelli JA, Rogers JE, Giannobile WV. Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2007;43:294-315.
51. Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol.* 1991;62:59–73.
52. Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems [review]. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:413-37.
53. Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LV. Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. *Infect Immun.* 1989;57:3194-203.

54. Kornman KS, di Giovine FS. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol.* 1998;3:327–38.
55. Kremer BH, van Steenberghe TJ. Peptostreptococcus micros coaggregates with *Fusobacterium nucleatum* and non-encapsulated *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;182:57-62.
56. Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 2004;39:101-6.
57. Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Schmidt AM. A murine model of accelerated periodontal disease in diabetes. *J Periodontal Res.* 1998;33:387-99.
58. Lalla E, Lamster IB, Drury S, Fu C, Schmidt AM. Hyperglycemia, glycoxidation and receptor for advanced glycation endproducts: potential mechanisms underlying diabetic complications, including diabetes-associated periodontitis [review]. *Periodontol 2000.* 2000;23:50-62.
59. 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;23:1405-11.
60. Li CH, Amar S. Morphometric, histomorphometric, and microcomputed tomographic analysis of periodontal inflammatory lesions in a murine model. *J Periodontol.* 2007;78:1120-8.

61. Liu YF, Wu LA, Wang J, Wen LY, Wang XJ. Micro-computerized tomography analysis of alveolar bone loss in ligature- and nicotine-induced experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 2010;45:714-9.
62. López NJ, Socransky SS, Da Silva I, Japlit MR, Haffajee AD. Subgingival microbiota of chilean patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2004;75:717-25.
63. 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;79:1597-605.
64. Oz HS, Puleo DA. Animal models for periodontal disease [review]. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:754857.
65. Page RC, Schroeder HE. Current status of the host response in chronic marginal periodontitis. *J Periodontol.* 1981;52:477-91.
66. Parsons CJ, Bradford BU, Pan CQ, Cheung E, Schauer M, Knorr A, et al. Antifibrotic effects of a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 antibody on established liver fibrosis in rats. *Hepatology.* 2004;40:1106-15.
67. Pfizenmaier K, Wajant H, Grell M. Tumor necrosis factors in 1996. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996;7:271-7.

68. 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;36:406-10.
69. Robinson M, Hart D, Pigott GH. The effects of diet on the incidence of periodontitis in rats. *Lab Anim*. 1991;25:247-53.
70. Rogers JE, Li F, Coatney DD, Rossa C, Bronson P, Krieder JM, et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2007;78:550-8.
71. 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;1:193-204.
72. Ryan ME, Golub LM. Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy. *Periodontol 2000*. 2000;24:226-38.
73. 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;23:1-6.
74. Sartori R, Li F, Kirkwood KL. MAP kinase phosphatase-1 protects against inflammatory bone loss. *J Dent Res*. 2009;88:1125-30.
75. Sbordone L, Bortolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related disease: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Investig*. 2003;7:181-8.

76. Sezer O, Heider U, Zavrski I, Kühne CA, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease [review]. *Blood*. 2003;101:2094-8.
77. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997;89:309-19.
78. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets [review]. *Periodontol 2000*. 2002;28:12-55.
79. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*. 2005;38:135-87.
80. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25:134-44.
81. Souza JA, Nogueira AV, de Souza PP, Cirelli JA, Garlet GP, Rossa C Jr. Expression of suppressor of cytokine signaling 1 and 3 in ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol*. 2011;56:1120-8.
82. Struillou X, Boutigny H, Soueidan A, Layrolle P. Experimental animal models in periodontology: a review. *Open Dent J*. 2010;4:37-47.
83. Tonetti MS, Claffey N. 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;32:210-3.

84. Trombetta-silva 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;90:477-82.
85. 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;72:620-5.
86. Wilensky A, Gabet Y, Yumoto H, Hour-Haddad Y, Shapira L. Three-dimensional quantification of alveolar bone loss in *Porphyromonas gingivalis*-infected mice using micro-computed tomography. *J Periodontol.* 2005;76:1282-6.
87. Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb J.* 1991;5:2145-54.
88. Yoneda M, Hirofuji T, Anan H, Matsumoto A, Hamachi T, Nakayama K, et al. Mixed infection of *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides forsythus* in a murine abscess model: involvement of gingipains in a synergistic effect. *J Periodontal Res.* 2001;36:237-43.
89. 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;38:1029-36.
90. Zubery Y, Dunstan CR, Story BM, Kesavalu L, Ebersole JL, Holt SC, et al. Bone resorption caused by three periodontal pathogens in vivo in mice is mediated in part by prostaglandin. *Infect Immun.* 1998;66:4158-62.

ANEXOS

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

Araraquara, 20 de março de 2012.

RAFAEL SCAF DE MOLON