



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

SABRINA GARCIA DE AQUINO

**INFLUÊNCIA DE PATÓGENOS PERIODONTAIS NA PATOGÊNESE DA
ARTRITE EXPERIMENTAL**

ARARAQUARA

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

SABRINA GARCIA DE AQUINO

**INFLUÊNCIA DE PATÓGENOS PERIODONTAIS NA PATOGÊNESE DA
ARTRITE EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Odontologia, Área de Concentração em
Periodontia, da Faculdade de Odontologia de
Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para
obtenção do título de Doutor em Odontologia

Orientador: *Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli*

ARARAQUARA

2012

Aquino, Sabrina Garcia de

Influência de patógenos periodontais na patogênese da artrite experimental / Sabrina Garcia de Aquino.-- Araraquara: [s.n.], 2012.
107 f. ; 30 cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

1. Artrite reumatóide - Etiologia 2. Doenças periodontais
3. Camundongos I. Título

SABRINA GARCIA DE AQUINO

**INFLUÊNCIA DE PATÓGENOS PERIODONTAIS NA PATOGÊNESE DA ARTRITE
EXPERIMENTAL**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

2º Examinador: Prof. Dr. Paulo Louzada

3º Examinador: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

4º Examinador: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico.

5º Examinador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

Araraquara, 2 de abril de 2012

DADOS CURRICULARES

SABRINA GARCIA DE AQUINO

NASCIMENTO: 17.07.1980 – São Paulo/SP

FILIAÇÃO: Gentil Carneiro de Aquino Junior

Antonia Garcia de Aquino

2000 - 2005: Curso de Graduação
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

2006 – 2008: Curso de Pós – Graduação em Periodontia
Nível: Mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

2008: Curso de Pós – Graduação em Odontologia- Área de
Concentração: Periodontia
Nível: Doutorado
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Dedicatória

A Deus

Sempre presente, seja nos momentos de dificuldade e tristeza, bem como nos de alegria e conquistas como este, iluminando o meu caminho para que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais

Apesar da distância e de meus momentos de ausência, vocês sempre estiveram ao meu lado. A princípio, questionaram minha escolha, mas depois, percebendo a importância que esta conquista significaria para mim, me apoiaram e incentivaram. Sem as oportunidades que vocês me proporcionaram desde sempre, nada disso seria possível. Amo vocês.

Aos amigos e familiares

Àqueles que, seja perto ou distante, verdadeiramente torceram por mim durante todo esse tempo, me incentivando a continuar, dando conselhos e também broncas quando preciso. Compartilho com vocês esse grande momento.

Agradecimentos

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho:

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, nas pessoas de seu Diretor, Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla e Vice-Diretora Profa. Dra. Andreia Affonso Barretto Montandon.

A todos os docentes do Curso de Pós-Graduação e aos docentes da Disciplina de Periodontia: Prof. Carlinhos, Adriana, Silvana, Egbert, Elcio, José Eduardo e Joni, pela formação e orientação.

Aos professores:

-Joni Cirelli, pela orientação, paciência, confiança e pela liberdade, o que contribuiu de maneira determinante para o meu crescimento não só profissional e intelectual, mas também pessoal. Obrigada também pela oportunidade de colaboração com outros grupos de pesquisa, o que contribuiu em muito para a realização deste nosso trabalho

-Fernando Cunha, pela oportunidade de integrar seu grupo de pesquisa, pelas importantes discussões científicas e ensinamentos que contribuíram muito para o meu crescimento profissional e intelectual. Certamente este trabalho não seria o mesmo

sem a sua contribuição Obrigada também pelos momentos de descontração propiciados ao longo destes anos.

-Wim B van den Berg, pela oportunidade de integrar seu excelente grupo de pesquisa durante o meu doutorado sanduíche na Radboud University Nijmegen Medical Centre - Holanda. Obrigada pelas importantes discussões científicas sobre este trabalho, suporte, disponibilidade e sobretudo confiança. Obrigada por aceitar esse desafio.

À Shahla, por toda orientação, dedicação, paciência, estímulo e contribuição fundamental no meu aperfeiçoamento científico, além da essencial participação no delineamento e discussão científica deste trabalho.

Ao professor Mario Julio Ávila Campos e sua equipe pela disponibilidade em fornecer as cepas bacterianas utilizadas neste estudo

À nossa equipe de trabalho:

-Depto de Diagnóstico e Cirurgia FOAr: Prof Joni Cirelli, Claudinha

-FMRP-USP -Laboratório de Inflamação e dor: Prof. Fernando Cunha, Jhimmy, Fabiane, Walter, Renata e Gil pela amizade e disponibilidade e dedicação na realização deste trabalho. Um agradecimento especial à Fabi e ao Jhimmy

-Radboud University: - Laboratório de Reumatologia Experimental: Birgitte, Monique e Liduine, pelo apoio técnico fundamental na realização deste estudo. Ao prof. Wim, Marije, Shahla e Renoud pelos ensinamento e importantes discussões científicas. Muito obrigada a todos pela dedicação a este trabalho e acima de tudo pela amizade, carinho, companheirismo em momentos de angústia e alegrias que vivemos juntos

À toda equipe do laboratório de Inflamação e dor: Giuliana, Kátia, Fabíola, Diva, Serginho, Ieda e Tadeu, pelo suporte técnico e amizade

Aos funcionários dos biotérios da FMRP e do CDL (Radboud University) pelo suporte na criação, distribuição e cuidado com os animais utilizados neste estudo.

À toda equipe do laboratório de Reumatologia Experimental pelo apoio, receptividade, carinho e acolhimento.

A todos os funcionários da FOAr, em especial:

- da Disciplina de Periodontia, entre estes: Claudinha, Regina Lúcia, D. Maria do Rosário, Zezé, Thelma, Sueli e Toninho, pela compreensão e prestatividade
- da Biblioteca, entre estes: Adriano, Ceres, Eliane, Maria Helena e Silvia pela colaboração.
- da Seção de Pós-Graduação, Alexandre, Flávia, Mara, Sérgio e Rosângela, pela paciência e cooperação.

À CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro, sem o qual não poderia realizar este trabalho

À minha turma do curso de Pós-Graduação: Andrés, Humberto, Marina, Nana, Roberta, Rodrigo, Rubens, Shelon, Wagner e Yeon. Apesar da correria e desencontros devido aos nossos trabalhos, compartilhamos momentos especiais de aprendizado e descontração durante o curso.

Aos demais companheiros do curso de Pós-Graduação que percorreram comigo esse caminho, compreendendo as nossas aflições de iniciantes e muitas vezes trocando experiências e nos orientando.

Aos colegas e grandes amigos da FMRP e laboratório de Inflamação e Dor: Jhimmy, Fabiane, Fernanda, Adriana, Kanashiro, Thiago, Fabrício, Rafael França, Rafael Panda, Rafael Poloni, Spiler, Paula, Larissa, Jaqueline, Renata, Walter, Silvia, Guilherme e Thiago, pela receptividade, ajuda e pelos , maravilhosos momentos de descontração que tivemos juntos.

Aos grandes amigos que tive a alegria e privilégio de encontrar durante a minha permanência na Holanda, em especial à Vivian, Niels, Chiara, Débora, Patrícia, Allan, Ana, Liduine, Miranda, Annet, Birgitte pela grande amizade, carinho, companheirismo e alegrias proporcionadas durante todo o período mesmo após terem seguido seus caminhos e estarmos distantes.

À Eulália, Fer, Fabi, Juliana Gardziulis, Morgana e Sabrininha pela amizade incondicional, apoio nos momentos difíceis, paciência, carinho e grandes alegrias compartilhadas.

A Deus, força inexplicável.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	8
Resumo.....	9
Abstract.....	11
Introdução.....	13
Proposição.....	21
Capítulo 1.....	23
Capítulo 2.....	45
Discussão.....	70
Conclusão.....	80
Referências.....	82
Anexos	89

Lista de abreviaturas

Aggregatibacter actinomycetemcomitans: *A. actinomycetemcomitans*

ACPA: anti-citrullinated protein antibodies

AIA: antigen-induced arthritis

APCs: antigen presenting cells

CIA: collagen-induced arthritis

Fim: fimbriae

IL-: interleukin

IGGs: immunoglobulins G

IFN γ : *Interferon gamma*

MCP-1: monocyte chemotactic protein-1

MMP: matrix metalloproteinase

OPG: osteoprotegerin

PAD(s): peptidylarginine deiminase(s)

PD: periodontal disease

PGE₂: prostaglandin E₂

PIA: pristane-induced arthritis

P. intermedia: *Prevotella intermedia*

P. nigrescens: *Prevotella nigrescens*

RA: rheumatoid arthritis

RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

SPF: specific pathogen free

TGF- β : transforming growth factor β

Th: T helper

TLRs: Toll-like receptors

TNF- α : tumor necrosis factor α

T reg: regulatory T

Aquino S.G. Influência de patógenos periodontais na patogênese da artrite experimental. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

Resumo

Embora a etiologia da artrite reumatóide (AR) não seja ainda totalmente elucidada, estudos sugerem a associação entre a AR e a doença periodontal (DP). Entretanto, os mecanismos envolvidos nessa interação ainda não são bem conhecidos. **Objetivo:** Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a interação da DP induzida por *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) e da artrite induzida por antígeno (AIA) em camundongos e, em seguida, investigar in vitro e in vivo a influência de *P. gingivalis* e *Prevotella nigrescens* (*P. nigrescens*) na severidade da artrite induzida por colágeno (CIA), com foco especial no fenótipo de células T. **Métodos:** Camundongos C57/Bl6 foram submetidos à AIA e/ou DP induzida por *P. gingivalis*. Perda óssea alveolar, histopatologia, hipernocicepção e produção de citocinas articular, bem como a porcentagem de células Th17 e T reg foram analisadas. Em seguida, o efeito de *P. gingivalis* e *P. nigrescens* na diferenciação de células T e o envolvimento dos receptores tipo Toll (TLRs) foram investigados in vitro. In vivo, camundongos com CIA receberam as inoculações orais de *P. gingivalis* e *P. nigrescens*. Histopatologia articular, expressão gênica sinovial, fenótipo de células T e a produção de anticorpos anti peptídeos citrulinados (ACPA) foram analisados. **Resultados:** AIA não modula a reabsorção óssea alveolar induzida por *P. gingivalis* enquanto camundongos com AIA expostos à *P. gingivalis* apresentam maior inflamação articular e perda de proteoglicanos. Além disso, o aumento da hipernocicepção e da produção articular de TNF- α e IL-17, bem como a porcentagem de células Th17 nos linfonodos drenantes articulares foram induzidos por *P. gingivalis* em camundongos imunizados e desafiados, enquanto o efeito sobre células T reg não foi verificado. In vitro, *P. gingivalis* e *P. nigrescens* ativaram, em células dendríticas, a produção de citocinas pró-inflamatórias e induziram forte diferenciação de Th17 e produção de IL-17 em co-cultura de células apresentadoras de antígenos (APCs) com células TCD4⁺, sobretudo na ausência do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra^{-/-}). Ambas as bactérias reduziram a diferenciação de Th2 e foram fracas indutoras de Th1. Além disso, a

indução de Th17 mostrou-se dependente de TLR2 nas APCs e a menor indução de Th1 dependeu da ativação de TLR2 nas células T. In vivo, patógenos periodontais aumentaram significativamente os escores clínicos de erosão óssea da CIA, mesmo na ausência de ACPA e sem afetar a cartilagem articular. Aumento significativo de IL-17, mas não de IFN γ , foi observado nos linfonodos articulares e os altos níveis de IL-17 foram fortemente relacionados com a erosão óssea articular. Além disso, *P. gingivalis* induziu MMP-9 e catepsina K na sinóvia enquanto apenas *P. nigrescens* reduziu expressivamente Th2/IL-4 in vivo. **Conclusão:** Estes dados evidenciam o papel patogênico de periodontopatógenos na AIA e CIA e revelam a modulação de células T, em particular a indução de Th17, como característica relevante de *P. gingivalis* e *P. nigrescens*, independente da produção de ACPA. Estes dados suportam a relevância dos patógenos periodontais na patogênese da artrite, especialmente em relação à erosão óssea. Suporte financeiro: FAPESP, grant #2008/08142-0 and 2009/00341-7; CAPES -PDEE process 3758/10-9 e VENI grant 916.12.039 da Organização Holandesa para Pesquisa Científica

Palavras-chave: Artrite reumatóide-Etiologia; Doenças periodontais; Camundongos

Aquino S.G. Influence of periodontal pathogens on pathogenesis of experimental arthritis. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012

Abstract

Although the etiology of rheumatoid arthritis (RA) remains unknown, several studies have suggested a pathologic link between RA and periodontal disease (PD). However, the mechanisms involved in this interaction are not well known. **Objectives:** The aim of this study was to evaluate the basis of *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)-induced PD and antigen-induced arthritis (AIA) interaction in mice, and further investigate the influence of *P. gingivalis* and *Prevotella nigrescens* (*P. nigrescens*) on severity of collagen-induced arthritis (CIA), with a special focus on T cell phenotype in vitro and in vivo. **Methods:** C57/Bl6 mice were subjected to antigen-induced arthritis (AIA) and/or *P. gingivalis*-induced PD. Alveolar bone loss, joint histopathology, articular hypernociception and cytokine production, as well as the percentage of Th17 and Treg cells from lymph nodes were analyzed. Thus, the effect of *P. gingivalis* and *P. nigrescens* on T cell differentiation and the involvement of Toll-like receptors (TLRs) were studied. In vivo, collagen-induced arthritis mice received oral inoculations of *P. gingivalis* or *P. nigrescens*. Joint histopathology, synovial gene expression, T cell phenotype, cytokine and anti-citrullinated peptides antibodies (ACPA) production were analyzed. **Results:** AIA does not modulate the alveolar bone resorption levels induced by *P. gingivalis* whereas AIA mice exposed to *P. gingivalis* presented higher articular inflammatory scores and proteoglycan loss, increased hypernociception and articular production of TNF- α and IL-17 as well as higher percentage of Th17 cells in articular draining lymph nodes, while no effect on T reg cells was verified. In vitro, *P. gingivalis* and *P. nigrescens* activated dendritic cells to produce T cell affecting proinflammatory cytokines as well as strongly induced Th17 differentiation and IL-17 production in a co-culture of splenic antigen-presenting cells (APCs) with CD4⁺ T cells. This effect was increased in the absence of IL-1 receptor antagonist. Both bacteria lowered Th2 differentiation and were weak inducers of Th1. Th17 induction was dependent on TLR2 expression on APCs; whereas the minor Th1 induction was dependent on TLR2 of T cells. In vivo, periodontal pathogens significantly increased the clinical scores and bone

erosion of CIA arthritis, even without detection of antibodies against citrullinated proteins (ACPA) with minor effect on cartilage destruction. Draining lymph nodes showed a significant increase of IL-17, but not IFN γ and IL-17 levels were strongly correlated with bone erosion. Moreover, *P. gingivalis* exclusively induced MMP-9 and Cathepsin K in synovium, while only *P. nigrescens* markedly reduced Th2/IL-4 phenotype in vivo. **Conclusion:** These data evidence the pathogenic role of *P. gingivalis* in AIA and CIA arthritis and reveals the modulation of T cell phenotype, in particular Th17 induction, as a relevant pathogenic characteristic of periodontal pathogens irrespective of ACPA induction. The data further support the relevance of periodontal bacteria in the pathogenesis of arthritis, especially with respect to bone erosion. **Financial support:** FAPESP, grant #2008/08142-0 and 2009/00341-7; CAPES -PDEE process 3758/10-9 and VENI grant 916.12.039: from Netherlands Organization for Scientific Research.

Keywords: Rheumatoid arthritis-Etiology; Periodontal diseases; Mice

INTRODUÇÃO

Introdução

A resposta inflamatória /imune do hospedeiro tem sido alvo de intensa investigação devido a seu papel determinante na manutenção da homeostase, bem como no início e progressão de diversas desordens de caráter auto-imune, inflamatório ou infeccioso. Entre estas, as doenças periodontais (DP) e a artrite reumatóide (AR) compartilham diversas semelhanças patológicas relacionadas, sobretudo, a alterações no perfil e níveis de citocinas e de seus antagonistas. Assim, este desequilíbrio imuno-inflamatório é responsável pela maior parte do dano tecidual observado na progressão dessas doenças.^{19, 28, 71}

As DPs são infecções de caráter inflamatório crônico cuja progressão é decorrente de um desequilíbrio no processo dinâmico saúde-doença entre a microbiota periodontopatogênica do biofilme dental e a resposta do hospedeiro a esses agentes²². Atualmente é bem estabelecido que a maior parte do dano tecidual é promovida de forma indireta, pela produção de uma exacerbada resposta inflamatória/imune a partir da ativação de células do sistema imunológico, inflamatórias e residentes. Assim, são verificados altos níveis de mediadores e citocinas pró-inflamatórias como: IL-*(interleukin)*-1 β , TNF- α (*tumor necrosis factor α*), IL-6, PGE2 (*prostaglandin E2*) produzidos por monócitos, macrófagos e fibroblastos ativados nos sítios periodontais doentes^{18, 22}. Desta forma, a DP pode ser considerada uma desordem mediada e modulada pelo hospedeiro na qual a resposta imuno-inflamatória tem um papel fundamental. Esta característica também está presente no estabelecimento e progressão da artrite reumatóide (AR), com a qual as doenças periodontais compartilham diversas semelhanças fisiopatológicas^{8, 23}. A AR é uma desordem sistêmica comum, de caráter auto-imune e inflamatório crônico, que afeta de 1 a 2% da população mundial, sobretudo mulheres de meia idade. É caracterizada pela progressiva destruição de cartilagem e tecido ósseo articular mediante intenso influxo de células inflamatórias ativadas no sinóvio articular⁴⁶. Mais especificamente, monócitos, células T e neutrófilos são encontrados em grande número nas cavidades articulares, promovendo liberação de diversos mediadores inflamatórios a partir da interação com células residentes e matriz, com subsequente dano tecidual⁶. As

citocinas pró-inflamatórias desempenham um papel relevante neste processo de destruição. Assim, IL-1 β e TNF- α são consideradas citocinas chave, por estimularem um aumento da produção de outras citocinas, enzimas degradativas e quimiocinas ⁴⁰. Neste contexto, é importante ressaltar o papel relevante do eixo inflamatório IL-23/IL-17 na patogênese da AR. IL-17 é uma proteína de 17kDa secretada por um recém descoberto subgrupo de células T de efectoras (ou T ativadas) denominado T helper (Th)-17 ¹⁰. A diferenciação de Th17 é induzida por IL-6 e TGF- β (*transforming growth factor β*) ¹⁰, enquanto IL-23, produzida por células dendríticas e macrófagos, é responsável por sua expansão ². IL-17 é capaz de ativar os mesmos eventos de IL-1 β e TNF- α ⁸⁵, atuando de forma sinérgica ^{37, 39, 49, 79}, ou independente ^{40, 47} em diversas desordens de caráter alérgico e também auto-imune, além da AR ^{30, 37}. Altos níveis de IL-17 têm sido detectados no fluido sinovial de pacientes com AR ^{13, 44, 88}. Além disso, IL-17 atua no processo inflamatório local pelo recrutamento e ativação de células imunes e residentes, como neutrófilos, fibroblastos, macrófagos, células endoteliais e epiteliais levando a uma excessiva produção de diversos mediadores como: TNF- α , IL-1, IL-6, PGE2, MMPs (*matrix metalloproteinases*) e quimiocinas como MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*) e IL-8 além de RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*), com subsequente dano tecidual ^{30, 40, 43, 44, 72}. Alguns autores sugerem que a maior função de IL-17 no tecido ósseo é a cooperação e/ ou sinergismo com outras citocinas com subsequente amplificação da inflamação ⁷³. No entanto, outros estudos in vitro ^{78, 82} e in vivo ⁵⁰ enfatizam que o mecanismo de ação de IL-23 ou de IL-17 na indução da reabsorção óssea na AR envolve alterações no eixo RANK-RANKL/OPG (*osteoprotegerin*) - (osteoclastogênese), bem como a participação de TNF- α . ^{44, 82}. A ação sinérgica de IL-17 e TNF- α na modulação da expressão de RANK-RANK-L também foi demonstrada em osteoblastos. ⁷⁸. Em estudos in vivo, a superexpressão de IL-17 em camundongos submetidos à artrite induzida por colágeno (CIA) resultou em um aumento dos níveis sinoviais de RANKL e reabsorção óssea, que foi inibida com o tratamento sistêmico com OPG ⁵⁰. Portanto, a ação conjunta de IL-17, TNF- α e RANK-L, bem como de IL-1 β , é capaz de promover a reabsorção óssea via formação de osteoclastos.

O papel de Th17 e do eixo IL-23/IL-17 na imunopatologia da DP ainda é discutido. Alguns trabalhos têm avaliado a presença e o papel de IL-17 isoladamente^{31, 75} ou sua relação com outros mediadores biológicos, como IFN γ (*Interferon gamma*)⁵³, na modulação da resposta imune a partir de biópsias de tecido gengival saudável ou com DP e obtenção de cultura celular^{31, 75}. Além disso, estudos relatam um aumento significativo da quantidade total de IL-17 no fluido crevicular gengival de pacientes com periodontite crônica. Assim, dentro das limitações desses estudos no que diz respeito à avaliação de tecidos periodontais de humanos, considerando a DP paciente e sítio-específica, com variáveis comportamentais e sistêmicas de difícil controle, a maior parte das evidências sugere uma ação pró-inflamatória de IL-17 na patogênese da DP como verificado para a AR, seja pela sua presença em maiores níveis nos sítios periodontais doentes, bem como pela indução da produção de outros mediadores proinflamatórios por diferentes tipos celulares, como por exemplo: IL1- β e TNF- α em macrófagos e IL-6, IL-8, pro-MMP1 e MMP3 em fibroblastos gengivais humanos. No entanto, estudo realizado em camundongos *knockout* para o receptor de IL-17 (IL-17RA^{-/-}) não demonstra uma atividade pró-inflamatória/destrutiva e sim um papel protetor de IL-17 na perda óssea inflamatória induzida por *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)⁸⁵ com uma alta destruição alveolar e baixos níveis séricos de quimiocinas e de migração neutrofílica verificados nesses animais *knockout*. Este efeito protetor foi justificado pelo papel chave de IL-17 no recrutamento inicial de neutrófilos. Já os modelos de artrite experimental retratam uma redução geral do processo inflamatório (inclusive do influxo de neutrófilos) e da destruição óssea e de cartilagem na ausência de IL-17, seja por terapia com anticorpo anti-IL-17⁴⁸ ou anti-receptores solúveis para IL-17^{11, 47}, bem como pelo uso de animais *knockout* para IL-17 ou IL-17R^{38, 65}. Assim, apesar das controvérsias sobre o papel patogênico ou protetor de IL-17 na DP, é indiscutível o papel essencial de Th17 e IL-17 no processo de destruição da cartilagem e tecido ósseo articular durante a AR. Entretanto, os mecanismos envolvidos na promoção da diferenciação e expansão de Th17 no estágio inicial da AR ainda são pouco compreendidos.

Apesar da vasta investigação no campo da AR, sua etiologia permanece indeterminada, embora se reconheça a influência genética no desenvolvimento de

doenças de caráter auto-imune ²⁴ e também o papel de estímulos ambientais como fatores externos potenciais para o estabelecimento dessas desordens. Neste contexto, a recente descoberta dos TLRs (*Toll-like receptors*) no tecido sinovial de pacientes com AR reforçou a hipótese do possível papel de agentes infecciosos na etiologia da AR; entre eles, a flora microbiana normal intestinal, ¹ bem como os patógenos periodontais. Esta origem infecciosa poderia explicar o acúmulo de células T e B imunocompetentes na lesão e algumas características clínicas observadas ⁸.

Em relação à possível participação dos periodontopatógenos na patogênese da AR, bem como da influência da AR na progressão da DP, a maior parte das evidências ainda é decorrente de estudos clínicos. Contrariamente aos estudos mais antigos, recentes evidências sugerem uma forte associação entre essas desordens inflamatórias crônicas, primariamente pelo comum desequilíbrio observado entre os níveis de citocinas pró e antiinflamatórias ⁶⁰. No entanto, afirma-se que essa relação não parece ser causal e é bidirecional ^{4, 8}. Alguns autores defendem a existência de um traço genético comum predispondo a essas alterações no que se refere à disfunção dos mecanismos inflamatórios fundamentais ^{29, 59, 60}. Além disso, tem sido sugerido que a periodontite pode interferir na AR pelos elevados níveis de mediadores inflamatórios, presença de antígenos bacterianos e IgGs (*immunoglobulins G*) no soro, bem como pela promoção de uma bacteremia transitória ⁸¹. Já em relação à influência da artrite na doença periodontal, é mencionado o maior risco de infecção caso o paciente faça uso de imunossupressor para tratamento. Além disso, destruição tecidual presente em desordens inflamatórias crônicas como a AR e DP pode ter um impacto sistêmico (e não apenas local) ²¹, como verificado, por exemplo, na relação de ambas as desordens com diferentes doenças cardiovasculares ^{9, 33}. Atualmente estudos clínicos têm investigado a condição periodontal de indivíduos com AR, demonstrando uma maior prevalência da DP nestes pacientes, com uma maior perda dental, maior frequência de sítios com perda de inserção avançada e bolsas periodontais mais profundas ^{8, 26, 29, 60, 68}. Já o controle da infecção obtido por meio da terapia periodontal reduz a severidade (sinais e sintomas) da AR ativa ^{4, 69}. Entretanto, a influência do tempo de duração e grau de severidade da AR é discutida, com grupos afirmando haver um crucial papel desses parâmetros na prevalência da DP e outros defendendo uma independência em

relação à duração e severidade na relação AR e DP. Outras divergências referem-se ao controle de higiene oral dos pacientes com AR e ao grau de inflamação gengival. Esta pode ser ou não resultado de uma higiene oral deficiente devido a uma disfunção motora e/ou psico-emocional. Além disso, o uso de medicamentos pelos pacientes com AR pode tanto mascarar o efeito da AR na severidade da DP, bem como afetar o risco de periodontite ²³ ao interferir na progressão ou modular a gengivite associada à placa, atuando como um fator de confundimento nestes estudos. Portanto, apesar das evidências clínicas indicarem uma potencial associação entre a AR e a DP, este é ainda um assunto bastante controverso. Isto porque existe uma falta de consenso entre os estudos clínicos, provavelmente influenciado por variações de desenho experimental e metodológicas. Além disso, considerando o pequeno número de estudos em animais neste campo, e, mais importante, a falta de conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na associação dessas duas desordens, as interferências funcionais entre a AR e DP merecem mais investigações. Neste sentido, uma linha de estudos que tem se destacado entre as investigações mais recentes sobre os mecanismos envolvidos na associação entre AR e DP é a avaliação do efeito de *P. gingivalis* na produção de ACPAs (*anti-citrillinated protein antibodies*). *P. gingivalis*, um dos mais importantes periodontopatógenos envolvidos na periodontite crônica, apresenta a exclusiva capacidade entre os procariotos de expressar a enzima PAD (*peptidylarginine deiminase*) funcional, capaz de promover não só a citrulinização de peptídios bacterianos bem como do hospedeiro, gerando assim antígenos citrulinados e, posteriormente, a produção de anticorpos que podem contribuir efetivamente na progressão da AR ^{51, 54, 70, 80}. Neste contexto, estudos clínicos têm detectado níveis elevados de títulos de anticorpos contra *P. gingivalis* em pacientes com AR, bem como uma positiva correlação entre os níveis de anticorpo contra *P. gingivalis* e isotipos de ACPAs específicos para auto-antígenos da AR ⁴⁵. Entretanto, além da expressão de PADs, é importante mencionar que *P. gingivalis* apresenta diversos fatores de virulência estruturais, bem como produtos do metabolismo que certamente contribuem de forma efetiva para seu potencial patogênico ^{15, 25, 64}. Neste contexto, podemos sugerir que *P. gingivalis* pode exercer sua influência na progressão da AR através de outro mecanismo além da produção de ACPAs. A maioria dos estudos em modelo animal

tem utilizado *P. gingivalis* para a indução da DP experimental ou como modelo extra-sinovial de inflamação crônica. Esses estudos demonstraram a aceleração e o aumento da severidade em camundongos ou ratos com artrite expostos à *P. gingivalis*, tanto inativada pelo calor, como viável em diferentes modelos de artrite.^{7, 12} A maioria das evidências corresponde a achados macroscópicos e histológicos sendo que o mecanismo exato pelo qual *P. gingivalis* afeta a progressão da artrite ainda é desconhecido. Além disso, é importante lembrar que a DP tem uma natureza polimicrobiana e, neste sentido, estudos clínicos têm sugerido a associação de outros patógenos periodontais que não expressam PADs à AR, entre eles *Agregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) e *Prevotella nigrescens* (*P. nigrescens*)^{57, 62}, o que reforça a hipótese da existência de outro mecanismo de ação dos patógenos periodontais sobre a AR. Assim, estudos em modelo animal com indução simultânea de AR e DP utilizando diferentes periodontopatógenos e modelos de artrite são interessantes, visando o melhor entendimento da possível associação entre essas patologias, com a vantagem de reduzir os vieses dos estudos clínicos e por fim, auxiliar na promoção de uma melhor atenção médica e periodontal aos pacientes com AR. Na literatura ainda são escassos os estudos com a indução concomitante de AR e de DP com o intuito de esclarecer os mecanismos envolvidos na relação entre essas duas doenças inflamatórias crônicas, sobretudo no que se refere a parâmetros inflamatórios/imunes comuns às duas desordens, entre eles, possivelmente, a via de Th17/IL-17.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

Hipótese

Há uma relação causal bidirecional em que a DP agrava a AR e vice-versa. Esta relação tem importante participação do padrão de resposta Th17.

Proposição específica 1

Considerando as crescentes evidências da possível participação causal de *P. gingivalis* na patogênese da artrite reumatóide, o objetivo do presente estudo foi investigar a influência da doença periodontal induzida pela inoculação de *P. gingivalis* na progressão da artrite induzida por antígeno (AIA) in vivo e vice-versa, com especial foco na modulação de Th17/IL-17 no processo de destruição articular.

Proposição específica 2

Considerando que os agentes infecciosos têm sido implicados na etiologia da artrite reumatóide (AR), o objetivo deste estudo foi investigar a influência dos patógenos periodontais *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) e *Prevotella nigrescens* (*P. nigrescens*) no fenótipo de células T helper in vitro e na severidade da artrite experimental induzida por colagénio (CIA) in vivo, com especial foco na modulação de células T.

CAPÍTULO 1

***Porphyromonas gingivalis* increases the severity of antigen-induced arthritis in mice**

S.G. DE AQUINO¹, J. TALBOT², F. SÔNEGO², W.M. TURATO², R. GRESPAN³, M.J.A. CAMPOS⁴, F.Q. CUNHA², and J.A. CIRELLI¹

¹Department of Diagnosis and Oral Surgery, Periodontic Division, Araraquara Dental School, Sao Paulo, Brazil

²Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil

³Department of Pharmacology Maringa State University

⁴Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences—ICB/USP, Sao Paulo, Brazil

Address correspondence and reprint requests to:

Joni Augusto Cirelli, PhD

Department of Diagnosis and Surgery

School of Dentistry at Araraquara

São Paulo State University - UNESP

Rua Humaitá, 1680

14801-903 Araraquara- SP, Brazil

Tel: +55-16-33016375, Fax: +55-16-33016369

E-mail: cirelli@foar.unesp.br

This study was performed within the framework of Brazilian founding agencies: CAPES (process: 3758/10-9) and FAPESP (grant #2008/08142-0 and 2009/00341-7).

Abstract:

Although the etiology of rheumatoid arthritis (RA) remains unknown, several studies have suggested a pathologic link between RA and periodontal disease (PD). However, the mechanisms involved in this interaction are still largely unclear. The present study aimed to evaluate the interaction of *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)-induced PD and antigen-induced arthritis (AIA) in mice, with a special focus on participation of Th17/IL-17. AIA did not modulate the alveolar bone resorption levels induced by oral inoculation of *P. gingivalis* whereas AIA mice exposed to *P. gingivalis* presented higher articular inflammatory scores and proteoglycan loss in comparison to all other groups. Moreover, increased mechanical hypernociception and intra-articular production of TNF- α and IL-17 were induced by *P. gingivalis* in AIA mice. In addition, the percentage of Th17 cells was also found higher in articular draining lymph nodes of AIA mice subjected to *P. gingivalis* infection, while no effect on T reg cells was verified in both lymph nodes subsets of these mice.

In conclusion, these data evidence the pathogenic role of *P. gingivalis* in pathogenesis of AIA, primarily mediated by Th17 and IL-17 induction, whereas experimental AIA does not modulate alveolar bone loss induced by *P. gingivalis*.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease of unknown etiology in which a chronic inflammation affects the joints, with a prevalent role of proinflammatory cytokines and lymphocyte activation on articular destruction. In this context, the activity of both Th17 subset and interleukin (IL)-17 have a major pathogenic role on RA where they are found in high levels within the inflamed joints and in blood of RA patients, especially in the early stages of disease. (1, 2). It's known that IL-17 participates effectively of cartilage and bone erosion observed during RA activating inflammatory and resident cells to release chemokines, proinflammatory cytokines and MMPs in the joint space (2-6).

However, the mechanisms that mediate the onset of the deregulated host response observed on RA, in special regarding to Th17/IL-17 activation, are still not clear and warrant further investigation. The discovery of TLRs in the synovial tissue and in Th17 cells reinforced the hypothesis of a possible role of microbiota or bacterial infections as triggers for the development of autoimmune diseases (7). Within this context, the influence of the microbial environment on RA progression was already shown in different Th17- driven models, where the spontaneous onset of disease was abrogated in germ-free or specific pathogen free (SPF) conditions (8-10). Moreover, other infectious agents than the intestinal microbiota have been implicated in RA etiology, including periodontal pathogens (11-14).

In last years, the link between periodontal disease (PD) and RA has been subjected to intensive research, primarily based on the similar pathophysiologic mechanisms shared by both disorders, specially a persistent chronic inflammation and subsequent tissue destruction (14-19). Most of the evidences in this field derive from clinical trials. For instance, case control studies verified a higher incidence and severity of PD in RA patients (16, 20-22), as well as a reduction of the severity of active RA with the control of PD infection (23-25). Moreover, the presence of oral bacterial DNA, including *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), was detected in the serum and synovial fluid of RA patients (26, 27) as well as increased antibody titers against *P. gingivalis*. (28) Considered one of the major causative agent in chronic periodontitis, *P. gingivalis* has been suggested an etiologic agent on RA because of its unique capability to produce peptidylarginine deiminases (PAD) enzymes and generate citrullinated antigens (29, 30). Thus, most of the investigations regarding to the mechanisms involved on PD-RA association are actually focused on the effect of *P. gingivalis* on Anti-Citrullinated Protein

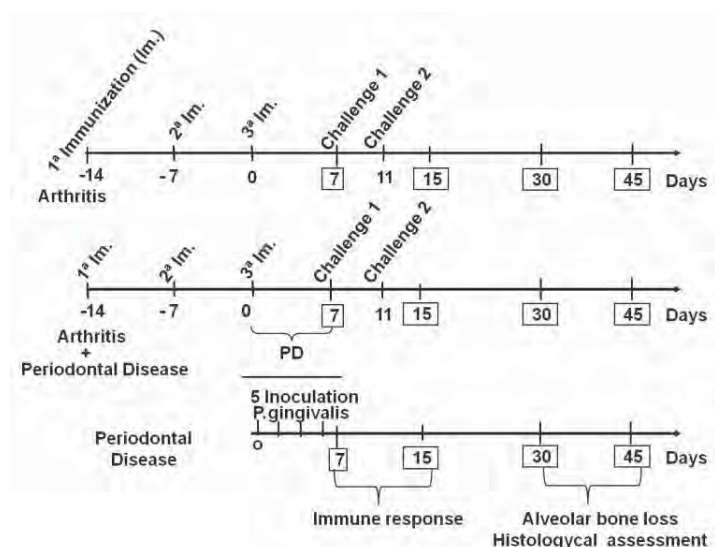
Antibody (ACPA) production. However, besides of PAD expression, it is important to consider that *P. gingivalis* presents diverse virulence factors which directly contribute to its pathogenicity on PD, including LPS, fimbriae (Fim) and gingipains (31-33). Thus, we speculated that *P. gingivalis* can participate on RA pathogenesis also through another mechanism than ACPA production.

Besides the epidemiologic evidences, animal studies have also been demonstrated the influence of *P. gingivalis* on arthritis onset and severity at macroscopic and histological levels in different experimental models (34, 35). However, the implication of *P. gingivalis* for pathogenesis of RA is still largely unknown considering the lack of mechanistic studies to support the actual evidences. Therefore, the aim of the present study was to investigate the influence of *P. gingivalis*-induced PD on disease severity of antigen-induced arthritis (AIA) and to elucidate the mechanism underlying arthritis breakdown, with a special focus on the participation of Th17 axis on PD-arthritis link.

Materials and methods

Animals. The experiments were performed on male C57BL/6 WT mice weighting between 18-22 g. Mice were housed in the animal facility of the Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirao Preto, University of São Paulo, Brazil and received water and food *ad libitum*. The studies protocols were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation (CEEA) of the School of Dentistry at Araraquara – UNESP and performed in accordance with the guidelines from the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA)

Experimental Design. C57/Bl6 mice were divided into 4 groups (n=5): Control (C): naïve mice; Arthritis (AR): antigen-induced arthritis with methylated bovine serum albumin (mBSA); Periodontal Disease (PD): *P. gingivalis* infection (5 oral inoculations of 10^8 CFU every other day) and ARPD: AIA followed by *P. gingivalis* inoculation, started 1 day before the last immunization (baseline). Animals were sacrificed: 7, 15, 30 and 45 days after baseline as shown in experimental design:



Induction of Experimental Arthritis (Antigen-induced arthritis - AIA). Mice were immunized as described previously (36) C57BL/6 mice were sensitized with a subcutaneous injection of 500 µg of methylated bovine serum albumin (mBSA - Sigma, St. Louis, MO) dissolved in an emulsion containing 0.1 ml phosphate buffered saline (PBS) and 0.1 ml of

Freund's complete adjuvant (CFA; 1 mg/ml of *Mycobacterium tuberculosis*-Sigma). Booster injections of mBSA in Freund's incomplete adjuvant (Sigma) were given 7 and 14 days after first immunization. Non-immunized (sham) mice received similar injections without mBSA. Arthritis was induced in immunized mice 21 days after the first injection through an intra-articular injection of mBSA (10 or 30 µg/cavity) dissolved in 10µl of saline into the femur–tibial joint.

Assessment of arthritis Knee joint inflammation was assessed histologically. For this purpose, total knee joints were isolated at the end point (day 30), fixed during 48 hours in 4% paraformaldehyde (PFA), then decalcified in 10% EDTA solution (pH 7.4 in PBS) and embedded in paraffin. Sagittal serial sections of 6µM were stained with Hematoxylin & Eosin (H&E) and scored in a blinded manner on a 0-3-point scale according to different parameters: synovial thickness, inflammatory infiltrate and cartilage/bone erosion, as described previously (37, 38). Proteoglycan depletion was also scored on Safranin O stained-sections using a scale of 0-3 based on staining intensity (37, 38) .

Induction of experimental periodontitis. Bacterial culture and periodontal infection were adapted from a previously described method (39). Experimental periodontitis was induced by oral inoculation with micropipette of 1×10^8 colony-forming units (CFU) of *P. gingivalis* ATCC 33277 (anaerobically grown on supplemented blood agar) diluted in 75 µl of phosphate-buffered saline with 2% of carboxymethylcellulose. A total of 5 oral inoculations were performed every other day and oral infection started 1 day before the last immunization with mBSA. Control group included noninfected mice, which received 2% carboxymethylcellulose alone on the same schedule.

Quantification of alveolar bone loss Extension of alveolar bone loss was measured in hemisected maxillas stained with methylene blue. Immediately after sacrifice, maxillae were collected and stored overnight in 3% hydrogen peroxide solution and the reminiscent soft tissue were deflesched mechanically. The palatal faces of the 1st and 2nd molars were positioned perpendicularly to the base and photographed (40 x magnification) using a stereomicroscope (Leica MZ6). The images were analyzed by a single blinded examiner with the Image J 1.34 software. The area comprised between the cement–enamel junction (CEJ) and the alveolar bone

crest (ABC) around the 1st and 2nd molars as well as the furcation length of the 1st molar were assessed in arbitrary units of area (AUA).

Mechanical nociceptive paw test –Articular hypernociception. Mechanical hypernociception of the femur-tibial joint was evaluated as previously reported (40) In a quiet room, mice were placed in acrylic cages (12 × 10 × 17 cm high) with wire grid floor 15-30 min before testing for adaptation. The test consisted of evoking a hindpaw flexion reflex with a handheld force transducer (electronic anesthesiometer, IITC Life Science, Woodland Hills, CA) adapted with a large polypropylene tip (4.15 mm 2 - IITC Inc., Life Science Instruments, Woodland Hills, CA, USA) for this model. The investigator was trained to apply the tip perpendicularly to the central area of the plantar hindpaw with a gradual increase in pressure to induce flexion of the femur–tibial joint followed by paw withdrawal. The intensity of the pressure was automatically recorded after paw withdraw using an electronic pressure-meter apparatus and the final value for the response was obtained by averaging of three subsequently consistent measurements. Considering that the nociceptive plateau is reached between 7 and 24 h (based on previous data of our group), the articular hypernociception was measured 10 hours after challenge. The measurements of the flexion-elicited mechanical threshold were expressed in grams (g).

Cytokine measurements. Levels of TNF- α , IL-1 β and IL-17 induced by mBSA challenge in the femur–tibial joint were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The cytokine levels were measured 10 h after mBSA injection (10 μ g). Briefly, knee joints were removed from the injected and control sides, frozen with liquid nitrogen, triturated and homogenized in 300 μ L of PBS. The homogenates were centrifuged at 10.000 g for 10 min and the supernatants collected for cytokine measurement by ELISA as described previously (40) using paired antibodies (R&D Systems). The results are expressed as picograms per joint (pg/joint) for each cytokine.

FACS analysis of T cells. After sacrifice, cervical and inguinal lymph nodes from mice of all groups were isolated and disrupted for subsequent staining of Th17 and T reg. cells. Briefly, TCD4⁺ cells were previously stained using anti-CD4-APC and then washed with FACS buffer (PBS + 1% bovine serum albumin) and fixed in PBS containing 2% paraformaldehyde.

Subsequently, after permeabilization with PMA (50ng/mL) and ionomycin (500ng/mL) during 4 hours, cells were stained with anti-IL-17-PE and FoxP3 in FACS buffer. An appropriate isotype-matched control antibody was used in all FACS analyses. All antibodies were from BD Biosciences-Pharmingen. Cells were analyzed on a FACS Canto II flow cytometer using the (FACS Diva) CellQuest software (BD Biosciences-Pharmingen).

Results

Antigen-Induced Arthritis does not modulate *P. gingivalis* induced alveolar bone resorption

To investigate whether arthritis could affect the progression of experimental periodontitis *in vivo*, we evaluated the severity of experimental PD induced by *P. gingivalis* in mice subjected to experimental arthritis induced by antigen (AIA). Hemimaxillaes stained with methylene blue were used to evaluate bone resorption at 30 days (Fig. 1A, C, E) and 45 days (Fig. 1B, D, F) after PD induction. Co-induction of arthritis and PD didn't induce the increase of alveolar bone loss when compared with mice subjected only to PD. Indeed, under our experimental conditions, AIA didn't promote alterations in alveolar bone levels, even in the presence of *P. gingivalis* infection.

Periodontal disease induced by *P. gingivalis* enhances arthritis articular hypernociception

To evaluate if periodontal disease induced by *P. gingivalis* could enhance articular hypernociception (arthritis-related articular pain) the mechanical nociceptive threshold was measured. Mice subjected to co-induction of arthritis and PD presented a significant increase of articular hypernociception in comparison to mice with only arthritis (Fig 2A). Thus, modulation of articular hypernociception, an important feature of arthritis, suggests a possible role of *P. gingivalis* on arthritis enhancement.

Periodontal disease induced by *P. gingivalis* increases articular levels of pro-inflammatory cytokines IL-17 and TNF- α in arthritis.

Considering the previous result showing that exposure of AIA mice to oral infection of *P. gingivalis* increases articular hypernociception, we next investigate if this effect of *P. gingivalis* could be associated with modulation of articular production of pro-inflammatory cytokines with known pro-nociceptive effect in AIA model (40). We found that the articular levels of TNF- α (Fig. 2B) and IL-17 (Fig. 2C) were higher in mice subjected to AIA and PD than in mice exposed only to AIA. Thus, the increase of articular levels of proinflammatory cytokines suggests a possible effect of *P. gingivalis* on arthritis enhancement through an induction of a local inflammatory response.

Periodontal disease induced by *P. gingivalis* increases the severity of articular damage in antigen-induced arthritis

To further confirm that PD could affect the progression of AIA, we evaluated joints histological changes on experimental arthritis developed by AIA mice 30 days after *P. gingivalis* infection. Non-challenged mice (C – control) or PD mice did not present evidences of synovial inflammation (asteristics), bone erosion (stealth arrows) or proteoglycan loss (open arrows) as arthritic mice (AR). (Fig. 3A) Importantly and in line with our previous data, the infection with *P. gingivalis* also enhanced the severity of articular damage induced by mBSA challenge in AIA mice (Fig. 3A, B, C). Periodontal disease induced by *P. gingivalis* displayed a higher inflammatory feature (Fig. 3A) and proteoglycan loss scores (Fig. 3B) in comparison to all other groups ($p < 0.05$). The presence of periodontitis also increased markedly the influx of inflammatory cells in the articular cavity (AC), with high number of mononuclear cells with pannus formation (synovial hyperplasia). Thus, the histological findings further support the pathogenic role of *P. gingivalis*-induced PD on disease severity during antigen-induced arthritis

Experimental periodontitis increases the frequencies of Th17 cells in draining lymph nodes but does not affect the frequencies of Treg in AIA model

It is reported that Th17/Treg imbalance plays important roles in immunopathology coordination of arthritis inflammation (41) Thus, in order to investigate if periodontitis-induced arthritis enhancement was mediated by changes in the T cell phenotype, more specifically, increasing of Th17 (pro-inflammatory) subset or reducing of Treg (suppressor) subset, analysis of total T cells from draining lymph nodes (DNLs) was performed. In addition to the increased intra-articular levels of IL-17, it was observed an increase in Th17 frequencies in DLNs of mice subjected to the co-induction of AIA and PD ($p < 0.05$) (Fig. 4A). However, it was not observed changes in Th17 frequencies in and not in the cervical lymph nodes that are near of *P. gingivalis* infection (Fig. 4B). Moreover, no effect of *P. gingivalis* on induction of Treg cells was verified in both cervical and inguinal lymph nodes subsets, suggesting no modulation of this T cell subset by *P. gingivalis* in arthritis (Fig. 4C and D). Therefore, under our experimental conditions, *P. gingivalis*-induced PD can increase the severity of arthritis possibly through an increase of Th17 population.

Discussion

Although epidemiologic data have been shown potential association between periodontal disease (PD) and rheumatoid arthritis (RA), this is still a controversial issue. Some years ago it was not clear if there was any real etiological link between these two diseases or if epidemiological results were just a statistical coincidence reinforced by common risk factors (42). Even more, there is a lack of consensual data among the clinical studies, probably influenced by variations regarding to the experimental design and methods. Considering the low number of animal studies in this field to date and, more importantly, the lack of mechanistic data regarding to how this functional interferences between PD and RA exactly occurs, this topic warrant further investigations. Within this context, C57BL/6 mice were subjected in our study to a co- induction of antigen-induced arthritis (AIA) and *P. gingivalis*- induced PD to evaluate the patterns of arthritis and PD development, followed by an especial focus on the influence of the influence of oral infection with *P. gingivalis* on arthritis progression and the mechanisms underlying this interaction in the context of Th17/IL-17 activity irrespective of ACPA production. This because, although recent investigations on PD-RA field have been point to a possible causal role for *P. gingivalis* on pathogenesis of RA through generation of ACPAs(19, 43, 44),we could not forget others potential virulence factors that *P. gingivalis* presents and that could contribute for the effect of periodontal pathogens on RA (31-33). Within this context, our study was designed to investigate whether the influence of *P. gingivalis* on experimental arthritis could be related to Th17 modulation.

Under our experimental conditions, we observed initially that AIA does not aggravate the alveolar bone resorption levels induced by *P. gingivalis*, whereas significantly higher articular inflammatory scores and proteoglycan loss were promoted by *P. gingivalis* infection in AIA mice in comparison to all groups. Regarding to the pattern of arthritis development, this result is in line with most of recent animal studies using *P. gingivalis* for induction of experimental PD or an extra synovial chronic inflammation model (34, 35). These studies showed previously an acceleration of arthritis onset as well as a more severe arthritis in arthritic mice exposed to *P. gingivalis*. These findings are mainly at macroscopic and histological levels, but how exactly this effect on arthritis progression occurs remained unknown. Within this context, we revealed another effect of *P. gingivalis* on pathogenesis of experimental arthritis: the enhancement of

some arthritis features like pain (mechanical hypernociception) and articular cytokines production in AIA mice pre-exposed to oral inoculation of *P. gingivalis*. Previous studies of our group revealed involvement of TNF- α , IL-1 β and IL-17 in mediating articular hypernociception during AIA in mice (40). First, it was shown that mechanical hypernociception induced by mBSA in AIA depended on the initial release of TNF- α (45). IL-17 participates in the cascade of events involved in the genesis of hypernociception during AIA, but not in zymosan-induced arthritis, a model of innate inflammation, suggesting that the pro-nociceptive effect of IL-17 is mainly observed during Th17-driven immune response (40). In this study, increased IL-17 levels were found in the mBSA-induced joint exudates. Corroborating with these findings, along with the increased hypernociception, we also found higher intra-articular levels of IL-17 and TNF- α induced by *P. gingivalis* infection in AIA mice. Therefore, we can suggest that *P. gingivalis* increases mBSA-induced mechanical hypernociception in AIA through the local induction of pro-nociceptive cytokines TNF- α and IL-17.

The higher articular inflammatory scores and proteoglycan loss histologically observed in AIA mice subjected to *P. gingivalis* infection is probably a consequence of the early local induction of TNF- α and IL-17 by this periodontal pathogen. A previous study showed that a strong antigenic stimulation is critical for Th17 differentiation and IL-17 induction. Thus, strong antigen/microbial-stimulation induced up regulation of CD-40-L on T cells and an optimal co-stimulatory signal to DCs, which results in increased IL-6 production and Th17 polarization (46). Within this context, we can infer that maintenance of consistent antigen stimuli, as found during a chronic periodontal disease, has a crucial role to increase Th17 subset and IL-17 levels observed in our experimental conditions. The unanswered question is how exactly local periodontal disease can influence the host response at a distal site of the joint environment. Some authors suggest that periodontal disease can have a systemic effect through the total inflamed/ulcerated area present in the periodontal diseased sites (34). It was also shown that a local chronic inflammation using heat killed *P. gingivalis* increased the systemic levels of proinflammatory cytokines suggesting also a distal effect through an increase of the systemic inflammatory condition (47). In the context of arthritis, the presence of bacterial fragments of oral bacteria DNA, including *P. gingivalis*, it was detected in the serum and synovial fluid of RA patients (26, 27, 34). The presence of free oral DNA forms in affected joints has been suggested as a great inducer of the innate immune system through TLR activation, triggering the synovial

inflammation and tissue destruction. Thus, it has been proposed that a binding of bacterial fragments in diseased joints can occur and trigger local infiltration of inflammatory cells, with an increase of Th17 related proinflammatory cytokines and subsequent cartilage and bone erosion(48). The literature supports the proinflammatory effect of IL-17 in the joint damage observed on RA stimulating the release of chemokines, proinflammatory cytokines, MMPs by resident and inflammatory cells (chondrocytes, synovial fibroblasts, and macrophages) (49, 50). Furthermore, the presence of increased levels of TNF- α , IL-1 β and IL-17 in RA patients are predictive of bone tissue destruction (51).

To further support our hypothesis that the influence of *P. gingivalis* on AIA progression is mediated by the effect on Th17/IL-17 subset, we also evaluated if this T cell population was increased in the draining lymph nodes. Indeed, similar to IL-17 local levels, the percentage of Th17 cells was also found increased in articular draining lymph nodes, although it was not increased on cervical subset of AIA mice exposed to *P. gingivalis*. Moreover, Treg levels were not altered by *P. gingivalis* in both cervical and popliteo/inguinal draining lymph nodes. Thus we can suggest that *P. gingivalis* can modulate the T-helper differentiation in the lymph node environment driving a skewed polarization to Th17 profile and related cytokines that can ultimately affect RA onset and severity. Within this context, our data corroborate with previous animal studies where it was shown the involvement of *P. gingivalis* and other periodontal pathogens in alterations of T cell profile. The potential role of *P. gingivalis* on T-cell polarization was shown in naive mice receiving an intramucosal model of bacterial inoculation. The induction of Th1/Th17 differentiation in the lymph nodes was dependent on activation of kinin system *P. gingivalis* through the proteolytic activity of gingipains (33). In addition, transcription factors related to T cell phenotypes (tBET, GATA3, and ROR γ T) were found upregulated in submandibular lymph nodes of mice submitted to experimental co-induction of pristane-induced RA (PIA) and *A. actinomycetemcomitans* -induced PD. (52) This resulted in increase of PD severity, but didn't affect the course of arthritis even using *P. gingivalis* for PD induction. Under our experimental conditions using the mBSA-induced arthritis model, Th17 levels are not altered in the cervical lymph nodes of AIA mice, but only on articular draining lymph nodes subset, which resulted subsequently in the increase of severity of AIA and no changes on alveolar bone loss primarily induced by *P. gingivalis*. Our data are in contrast with a recent study that detected the presence of alveolar bone loss and periodontal inflammation in mice with AIA only (53). The

possible explanation for this controversial finding is the differences in the normal flora presented by the mice in this study, which could influence the experimental PD outcome. Moreover, in this same study it was not observed the modulation of AIA by experimental PD that we verified under our experimental conditions. The reason for this discrepancy can be attributed possibly by the use of a different periodontal pathogen for PD induction instead of *P. gingivalis* in this study: *Agregatibacter Actinomycetemcomitans* (*A. Actinomycetemcomitans*). Therefore, under our experimental conditions, antigen induced arthritis did not modulate the alveolar bone loss even in the presence of *P. gingivalis*.

Taken together, our data evidences the pathogenic role of *P. gingivalis* in pathogenesis of antigen induced arthritis possibly mediated by the increase of Th17 population and local IL-17 induction. Thus we can suggest that *Porphyromonas gingivalis* can modulate the T-helper differentiation in the lymph node environment driving a skewed polarization to Th17 profile and related cytokines that can ultimately affect RA onset and severity. More studies in different animal models are necessary to further support this data.

Figure legends

Figure 1- AIA does not modulate alveolar bone loss induced by *P. gingivalis*. C57BL/6 mice were infected orally with *P. gingivalis* as described in methods. Representative images of hemimaxillaes evaluated for quantification of alveolar bone loss by staining with methylene blue (Fig. 1A – 30 and Fig. 1B – 45 days). Histomorphometrical alveolar bone loss quantification (CEJ-ABC distance in furcation region of 1st maxillary molar (Fig. 1C– 30 and Fig. 1D – 45 days) - and (CEJ-ABC area around 1st and 2nd maxillary molars (Fig. 1E– 30 and Fig. 1B – 45 days) in the palatal face of maxillary molars. Results are represented by mean $\pm$ SEM and * $p < 0.05$ vs control and # $p < 0.05$ vs RA (ANOVA followed by Bonferroni's test).

Figure 2- *P. gingivalis*-induced PD modulates inflammatory parameters of articular injury.

Fig.A: Increased mechanical hypernociception induced by *P. gingivalis* in AIA model. Mechanical threshold was evaluated 10 h after mBSA injection (10 μ g) or saline in the femur–tibial joint of C57 bl/6 mice subjected or not to AIA and to periodontal disease (7 days after first *P. gingivalis* inoculation). Increased intra-articular levels of TNF- α (Fig. B) and IL-17 (Fig. C) induced by *P. gingivalis* in AIA model (7 days of PD). The results are expressed as mean $\pm$ SEM and * $p < 0.05$ x control and # $p < 0.05$ x AR (ANOVA followed by Tukey test).

Figure 3- *P. gingivalis*-induced PD enhances the severity of articular injury during antigen-induced arthritis. Representative scores of severity of AR (Fig. A) and proteoglycan depletion (Fig. B) – period of 30 days showing higher articular inflammatory scores and proteoglycan loss in mice subjected to co-induction of antigen-induced arthritis and *P. gingivalis* infection (ARPD group). The results are expressed as mean $\pm$ SEM and * $p < 0.05$ x control and # $p < 0.05$ x AR (ANOVA followed by Tukey test). C – Representative images of joint histology; upper panel show H&E stained sections: asteristics and stealth arrows indicate inflammatory infiltrate and bone erosion, respectively; lower panel show safranin O –staining and open arrows indicate proteoglycan depletion.

Figure 4- Experimental periodontitis increases Th17 subset in articular draining lymph nodes and does not affect the expression of Treg in AIA model. After sacrifice, popliteal and inguinal lymph nodes from C57/bl6 mice were isolated and disrupted and processed for flow

citometry staining of Th17 and T reg. cells. Percentage of TCD4⁺ IL-17⁺ (Fig. A) and TCD4⁺Foxp3⁺ (Fig. B) cels from inguinae and cervical lymph nodes from mice subjected or not to AIA and/or periodontal disease induction (*P. gingivalis* – 15 days). Cells were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer using the CellQuest software (BD Biosciences-Pharmingen).

Statistical Analysis. Data are presented as means +/- SEM and are representative of 2 separate experiments. The means from different groups were compared by ANOVA with Tukey's correction. Statistical significance was set at $P < 0.05$.All statistical tests were performed with the GraphPad Prism version 4.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Figures

Figure 1

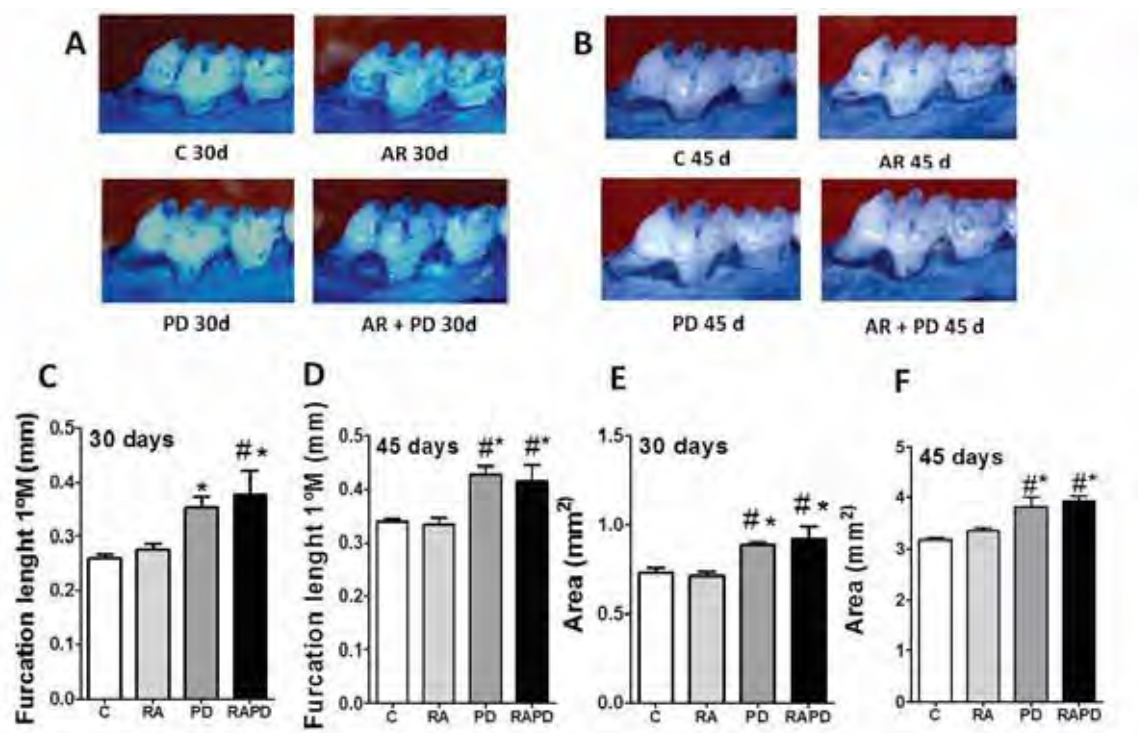


Figure 2

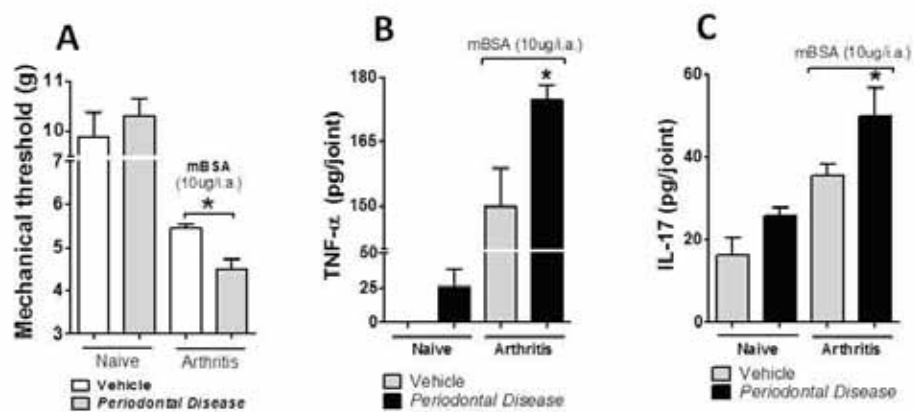


Figure 3

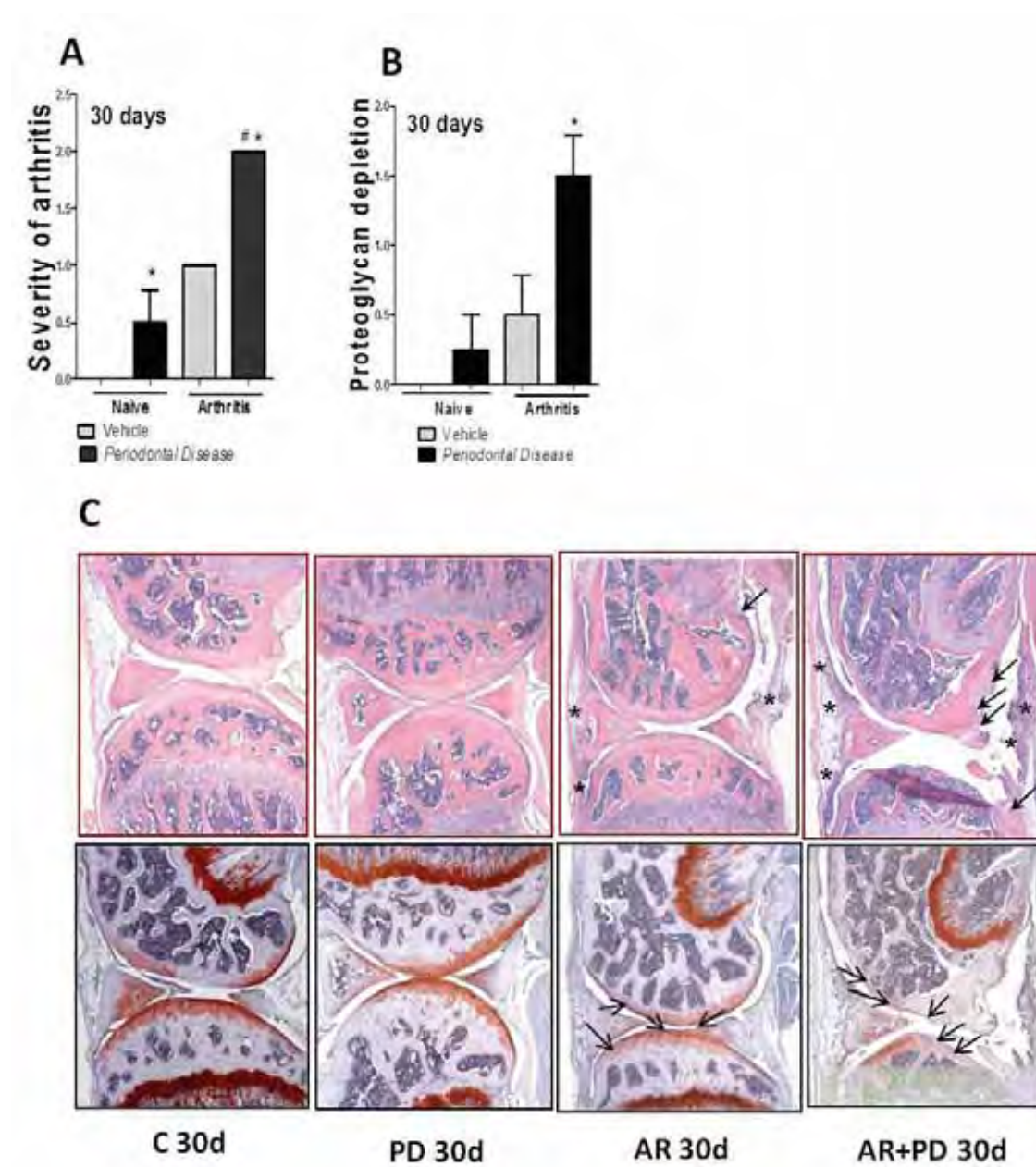
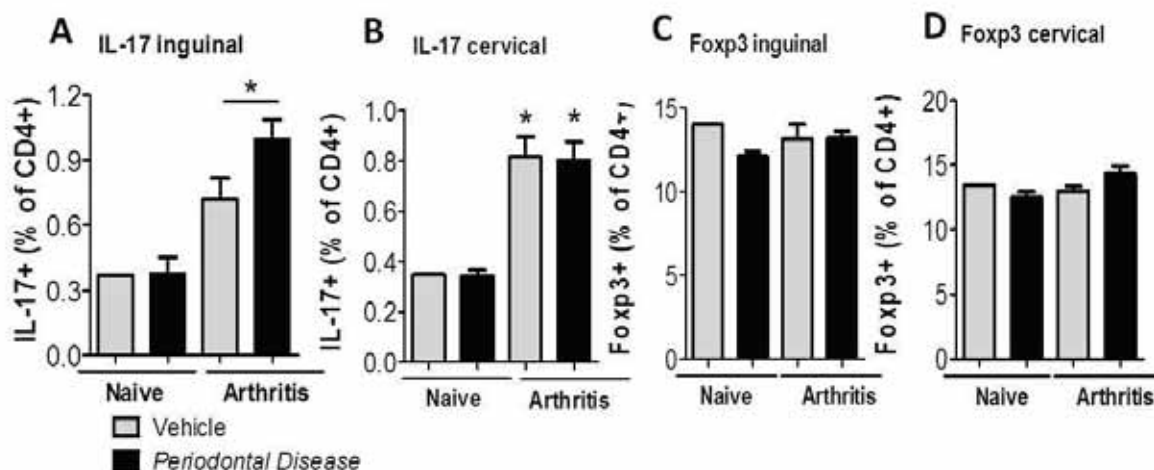


Figure 4



References

References:

1. Evans, H. G., Gullick, N. J., Kelly, S., Pitzalis, C., Lord, G. M., Kirkham, B. W., & Taams, L. S. (2009) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 6232-6237.
2. Gaffen, S. L. (2009) *Current rheumatology reports* **11**, 365-370.
3. Jovanovic, D. V., Martel-Pelletier, J., Di Battista, J. A., Mineau, F., Jolicoeur, F. C., Benderdour, M., & Pelletier, J. P. (2000) *Arthritis and rheumatism* **43**, 1134-1144.
4. Ruddy, M. J., Shen, F., Smith, J. B., Sharma, A., & Gaffen, S. L. (2004) *Journal of leukocyte biology* **76**, 135-144.
5. Lubberts, E., van den Bersselaar, L., Oppers-Walgreen, B., Schwarzenberger, P., Coenen-de Roo, C. J., Kolls, J. K., Joosten, L. A., & van den Berg, W. B. (2003) *J Immunol* **170**, 2655-2662.
6. Zhang, F., Tanaka, H., Kawato, T., Kitami, S., Nakai, K., Motohashi, M., Suzuki, N., Wang, C. L., Ochiai, K., Isokawa, K., et al. *Biochimie* **93**, 296-305.
7. McInnes, I. B. & Schett, G. *The New England journal of medicine* **365**, 2205-2219.
8. Hida, S., Miura, N. N., Adachi, Y., & Ohno, N. (2007) *Biological & pharmaceutical bulletin* **30**, 1589-1592.
9. Abdollahi-Roodsaz, S., Joosten, L. A., Koenders, M. I., Devesa, I., Roelofs, M. F., Radstake, T. R., Heuvelmans-Jacobs, M., Akira, S., Nicklin, M. J., Ribeiro-Dias, F., et al. (2008) *The Journal of clinical investigation* **118**, 205-216.
10. Wu, H. J., Ivanov, I., Darce, J., Hattori, K., Shima, T., Umesaki, Y., Littman, D. R., Benoist, C., & Mathis, D. *Immunity* **32**, 815-827.
11. Andreaskos, E., Sacre, S., Foxwell, B. M., & Feldmann, M. (2005) *Front Biosci* **10**, 2478-2488.
12. Corr, M. (2005) *Arthritis and rheumatism* **52**, 2233-2236.
13. Moen, K., Bertelsen, L. T., Hellem, S., Jonsson, R., & Brun, J. G. (2005) *Oral diseases* **11**, 27-34.

14. de Pablo, P., Chapple, I. L., Buckley, C. D., & Dietrich, T. (2009) *Nature reviews* **5**, 218-224.
15. Bartold, P. M., Marshall, R. I., & Haynes, D. R. (2005) *Journal of periodontology* **76**, 2066-2074.
16. Bozkurt, F. Y., Yetkin Ay, Z., Berker, E., Tepe, E., & Akkus, S. (2006) *Cytokine* **35**, 180-185.
17. Havemose-Poulsen, A., Sorensen, L. K., Stoltze, K., Bendtzen, K., & Holmstrup, P. (2005) *Journal of periodontology* **76**, 2276-2285.
18. Moen, K., Brun, J. G., Madland, T. M., Tynning, T., & Jonsson, R. (2003) *Clinical and diagnostic laboratory immunology* **10**, 1043-1050.
19. Ogrendik, M., Kokino, S., Ozdemir, F., Bird, P. S., & Hamlet, S. (2005) *MedGenMed* **7**, 2.
20. Al-Shammari, K. F., Al-Khabbaz, A. K., Al-Ansari, J. M., Neiva, R., & Wang, H. L. (2005) *Journal of periodontology* **76**, 1910-1918.
21. Mercado, F., Marshall, R. I., Klestov, A. C., & Bartold, P. M. (2000) *Journal of clinical periodontology* **27**, 267-272.
22. Mercado, F. B., Marshall, R. I., Klestov, A. C., & Bartold, P. M. (2001) *Journal of periodontology* **72**, 779-787.
23. Ribeiro, J., Leao, A., & Novaes, A. B. (2005) *Journal of clinical periodontology* **32**, 412-416.
24. Al-Katma, M. K., Bissada, N. F., Bordeaux, J. M., Sue, J., & Askari, A. D. (2007) *J Clin Rheumatol* **13**, 134-137.
25. Ortiz, P., Bissada, N. F., Palomo, L., Han, Y. W., Al-Zahrani, M. S., Panneerselvam, A., & Askari, A. (2009) *Journal of periodontology* **80**, 535-540.
26. Moen, K., Brun, J. G., Valen, M., Skartveit, L., Eribe, E. K., Olsen, I., & Jonsson, R. (2006) *Clinical and experimental rheumatology* **24**, 656-663.
27. Martinez-Martinez, R. E., Abud-Mendoza, C., Patino-Marin, N., Rizo-Rodriguez, J. C., Little, J. W., & Loyola-Rodriguez, J. P. (2009) *Journal of clinical periodontology* **36**, 1004-1010.
28. Mikuls, T. R., Payne, J. B., Reinhardt, R. A., Thiele, G. M., Maziarz, E., Cannella, A. C., Holers, V. M., Kuhn, K. A., & O'Dell, J. R. (2009) *International immunopharmacology* **9**, 38-42.
29. Rosenstein, E. D., Greenwald, R. A., Kushner, L. J., & Weissmann, G. (2004) *Inflammation* **28**, 311-318.
30. Wegner, N., Wait, R., Sroka, A., Eick, S., Nguyen, K. A., Lundberg, K., Kinloch, A., Culshaw, S., Potempa, J., & Venables, P. J. *Arthritis and rheumatism* **62**, 2662-2672.
31. Darveau, R. P., Pham, T. T., Lemley, K., Reife, R. A., Bainbridge, B. W., Coats, S. R., Howald, W. N., Way, S. S., & Hajjar, A. M. (2004) *Infection and immunity* **72**, 5041-5051.
32. Hajishengallis, G., Ratti, P., & Harokopakis, E. (2005) *The Journal of biological chemistry* **280**, 38902-38913.
33. Monteiro, A. C., Scovino, A., Raposo, S., Gaze, V. M., Cruz, C., Svensjo, E., Narciso, M. S., Colombo, A. P., Pesquero, J. B., Feres-Filho, E., *et al.* (2009) *J Immunol* **183**, 3700-3711.
34. Bartold, P. M., Marino, V., Cantley, M., & Haynes, D. R. *Journal of clinical periodontology* **37**, 405-411.
35. Cantley, M. D., Haynes, D. R., Marino, V., & Bartold, P. M. *Journal of clinical periodontology* **38**, 532-541.
36. Grespan, R., Fukada, S. Y., Lemos, H. P., Vieira, S. M., Napimoga, M. H., Teixeira, M. M., Fraser, A. R., Liew, F. Y., McInnes, I. B., & Cunha, F. Q. (2008) *Arthritis and rheumatism* **58**, 2030-2040.
37. Dudler, J., Renggli-Zulliger, N., Busso, N., Lotz, M., & So, A. (2000) *Annals of the rheumatic diseases* **59**, 529-532.
38. van Holten, J., Reedquist, K., Sattonet-Roche, P., Smeets, T. J., Plater-Zyberk, C., Vervoordeldonk, M. J., & Tak, P. P. (2004) *Arthritis research & therapy* **6**, R239-249.
39. Trombone, A. P., Claudino, M., Colavite, P., de Assis, G. F., Avila-Campos, M. J., Silva, J. S., Campanelli, A. P., Ibanez, O. M., De Franco, M., & Garlet, G. P. (2010) *Genes and immunity* **11**, 479-489.

40. Pinto, L. G., Cunha, T. M., Vieira, S. M., Lemos, H. P., Verri, W. A., Jr., Cunha, F. Q., & Ferreira, S. H. *Pain* **148**, 247-256.
41. Cope, A. P., Schulze-Koops, H., & Aringer, M. (2007) *Clinical and experimental rheumatology* **25**, S4-11.
42. Farquharson, D., Butcher, J. P., & Culshaw, S. *Mucosal immunology* **5**, 112-120.
43. Liao, F., Li, Z., Wang, Y., Shi, B., Gong, Z., & Cheng, X. (2009) *Medical hypotheses* **72**, 732-735.
44. Hitchon, C. A., Chandad, F., Ferucci, E. D., Willemze, A., Ioan-Facsinay, A., van der Woude, D., Markland, J., Robinson, D., Elias, B., Newkirk, M., *et al.* *The Journal of rheumatology* **37**, 1105-1112.
45. Cunha, T. M., Verri, W. A., Jr., Valerio, D. A., Guerrero, A. T., Nogueira, L. G., Vieira, S. M., Souza, D. G., Teixeira, M. M., Poole, S., Ferreira, S. H., *et al.* (2008) *European journal of pain (London, England)* **12**, 1059-1068.
46. Iezzi, G., Sonderegger, I., Ampenberger, F., Schmitz, N., Marsland, B. J., & Kopf, M. (2009) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 876-881.
47. Bronstein-Sitton, N., Cohen-Daniel, L., Vaknin, I., Ezernitchi, A. V., Leshem, B., Halabi, A., Hourihadad, Y., Greenbaum, E., Zakay-Rones, Z., Shapira, L., *et al.* (2003) *Nature immunology* **4**, 957-964.
48. Heikenwalder, M., Polymenidou, M., Junt, T., Sigurdson, C., Wagner, H., Akira, S., Zinkernagel, R., & Aguzzi, A. (2004) *Nature medicine* **10**, 187-192.
49. Kitsis, E. & Weissmann, G. (1991) *Clinical orthopaedics and related research*, 63-72.
50. Kleinschultz, C., Hofstetter, H. H., Meuth, S. G., Braeuninger, S., Sommer, C., & Stoll, G. (2006) *Experimental neurology* **200**, 480-485.
51. Kirkham, B. W., Lassere, M. N., Edmonds, J. P., Juhasz, K. M., Bird, P. A., Lee, C. S., Shnier, R., & Portek, I. J. (2006) *Arthritis and rheumatism* **54**, 1122-1131.
52. Trombone, A. P., Claudino, M., Colavite, P., de Assis, G. F., Avila-Campos, M. J., Silva, J. S., Campanelli, A. P., Ibanez, O. M., De Franco, M., & Garlet, G. P. *Genes and immunity* **11**, 479-489.
53. Queiroz-Junior, C. M., Madeira, M. F., Coelho, F. M., Costa, V. V., Bessoni, R. L., Sousa, L. F., Garlet, G. P., Souza Dda, G., Teixeira, M. M., & Silva, T. A. *J Immunol* **187**, 3821-3830.

CAPÍTULO 2

Periodontal Pathogens Directly Promote Autoimmune Arthritis by Inducing a Toll-like Receptor 2 and Interleukin-1 Driven Th17 Response

S. G. de Aquino^{1,2,*}, S. Abdollahi-Roodsaz^{1,*}, M.I. Koenders¹, F.A. van de Loo¹, G.J.M. Pruijn³, R.J. Marijnissen¹, B. Walgreen¹, M. Helsen¹, L. van den Bersselaar¹, M.J. Avila Campos⁴, F. Q. Cunha⁵, J.A. Cirelli², W.B. van den Berg¹

* Equally contributing authors

¹Rheumatology Research and Advanced Therapeutics, Department of Rheumatology, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands

²Department of Diagnosis and Oral Surgery, Periodontic Division, Araraquara Dental School, Sao Paulo, Brazil

³Department of Biomolecular Chemistry, Radboud University Nijmegen, The Netherlands

⁴Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences—ICB/USP, Sao Paulo, Brazil

⁵Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil

Address correspondence and reprint requests to:

Shahla Abdollahi-Roodsaz

Rheumatology Research and Advanced Therapeutics, Department of Rheumatology 272

Radboud University Nijmegen Medical Centre

PO Box 9101, 6500HB, Nijmegen, the Netherlands

Phone: +31-24-3616619; Fax: +31-24-3540403

E-mail: s.abdollahi-roodsaz@reuma.umcn.nl

*Artigo submetido ao Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS) – Anexo 2

Abstract

The periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* has been linked to the pathogenesis of rheumatoid arthritis because of its ability to citrullinate mammalian proteins and to induce anti-citrullinated peptide antibodies (ACPA). Based on the critical role of pathogen-mediated Toll-like receptor (TLR) activation in instructing the T cell response, we hypothesized that periodontal pathogens may directly affect autoimmune arthritis through modulation of T cell response, rather than solely via ACPA induction. In the present paper, we provide the first evidence of the involvement of *P. gingivalis* in the pathogenesis of auto-immune arthritis through induction of an interleukin-1 (IL-1)-driven Th17 response. The Th17 induction capacity strongly depended on activation of TLR2 on antigen-presenting cells and was remarkably shared by another major periodontal pathogen, *Prevotella nigrescens*, lacking citrullination capability. Lack of endogenous IL-1 receptor antagonist caused a dramatic increase in Th17 induction by these bacteria. When applied *in vivo*, both *P. gingivalis* and *P. nigrescens* promoted the antigen-specific Th17 response and aggravated the severity of arthritic bone erosion. This occurred under conditions where ACPA against major citrullinated peptide candidates were undetectable, but instead the levels of IL-17 induced by periodontal pathogens directly correlated with the intensity of bone erosion. In addition, while *P. gingivalis* induced local joint-destructive factors in synovial tissue, only *P. nigrescens* suppressed the anti-inflammatory IL-4 production by T cells during arthritis. Our data reveal a novel role for periodontal pathogens in the pathogenesis of autoimmune arthritis directly through modulation of T cell phenotype and irrespective of their citrullination capability.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease characterized by chronic inflammation in multiple joints. Production of proinflammatory cytokines and activation of lymphocytes are crucial events in the pathogenesis of RA [1, 2]. In this line, the T helper 17 (Th17) lymphocytes and interleukin-17 (IL-17) have been recognized as essential mediators of cartilage and bone destruction. The number of Th17 cells is increased in the early stages of the disease. However, the mechanisms involved in promoting the Th17 differentiation are poorly understood. In light of the critical role of innate immunity in instructing the T cell response and the increasing evidence for the involvement of Toll-like receptors (TLRs) in RA, normal as well as infectious microbiota have recently emerged as triggers for RA [3]. In this context, the influence of microbial environment on arthritis was shown in several Th17-driven mouse models, where the spontaneous onset of the disease was abrogated under germ-free or specific pathogen free (SPF) conditions [4-6]. Furthermore, the development of arthritis was shown to be affected by TLR2 and TLR4 activation, which differentially skewed the T cell balance *in vivo* [5].

In addition to normal microbiota, infectious agents, including periodontal pathogens have been increasingly implicated in the etiology of RA [7-9]. The link between periodontal disease (PD) and RA has primarily been based on shared pathophysiologic processes and is well supported by growing epidemiologic evidence [9, 10]. For instance, case control studies have verified a higher incidence of PD in RA patients [11-13]. Other studies showed a reduction of the severity of active RA when the accompanying PD was successfully treated [14-16]. In addition, DNA from oral bacteria, including *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella nigrescens*, as well as increased antibody titers against *P. gingivalis* have been detected in serum and synovial fluid of RA patients [17, 18]. *P. gingivalis*, considered the major causative agent of chronic periodontitis, has been linked to RA mainly because of its unique ability to express the enzyme peptidyl-arginine deiminase (PAD) [19, 20]. This enzyme can promote citrullination of mammalian proteins and trigger the production of anti-citrullinated peptide antibodies (ACPA) [20]. ACPA are highly specific to RA and are associated with increased inflammatory cytokine production in patients [21]. Nevertheless, the actual implication of periodontal bacteria in pathogenesis of RA remains largely unknown to date.

Recently, some animal studies predominantly using *P. gingivalis* as the periodontal pathogen suggested the influence of PD on experimental arthritis [22, 23]; however, no mechanistic insight was provided. Based on the significant role of pathogen-mediated TLR activation in shaping the T cell response, we reasoned that the interaction between PD and RA may in part be a direct result of T cell skewing and hence, may not necessarily be limited to the PAD expressing *P. gingivalis*. Therefore, we set out to study the net effect of periodontal pathogens on antigen-presenting cells and the T cell balance *in vitro*. Furthermore, we investigated the impact of *P. gingivalis* and *P. nigrescens*, the latter as a representative PAD-negative pathogen, on the severity of experimental arthritis with special focus on T cell phenotype *in vivo*. The data show a TLR2-dependent Th17 skewing by both bacteria with a marked involvement of IL-1. We provide here the first evidence of a substantial effect of periodontal pathogens, irrespective of their ACPA inducing capability, on T cell balance in the context of autoimmune arthritis with a remarkable impact on disease severity.

Results

Periodontal pathogens *P. gingivalis* and *P. nigrescens* activate dendritic cells to produce T cell affecting proinflammatory cytokines. To determine whether periodontal pathogens cause DC maturation and production of cytokines that would affect T cell differentiation, mouse bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) were stimulated with *P. gingivalis* and *P. nigrescens*. Since IL-1 is important for DC activation and Th17 differentiation, and considering the spontaneous development of a TLR/Th17-dependent arthritis in IL-1 receptor antagonist deficient (IL-1Ra^{-/-}) mice, effects of periodontal bacteria on WT and IL-1Ra^{-/-} DCs were compared. Stimulation with *P. gingivalis* and *P. nigrescens* as well as *E. coli* LPS (positive control for DC maturation) induced maturation of DCs, as measured by CD86 and CD40 expression (Fig. 1A and S1A). The degree of maturation was not affected by IL-1Ra deficiency (Fig. 1A). Furthermore, both *P. gingivalis* and *P. nigrescens* induced high production of proinflammatory cytokines including TNF α , IL-6 and IL-1 β (Fig. 1B and C and S1B). Low levels of IL-12 were also detected (Fig. 1D). In spite of similar maturation, IL-1Ra^{-/-} DCs produced higher concentrations of proinflammatory cytokines compared to WT DCs, except for IL-1 β itself (Fig. 1B-D and S1B). Moreover, *P. gingivalis* was a stronger inducer of proinflammatory cytokines in BMDCs compared to *P. nigrescens*.

***P. gingivalis* and *P. nigrescens* strongly induce Th17 differentiation, an effect highly promoted in the absence of IL-1R antagonist.** Next, we investigated the influence of periodontal pathogens on T cell differentiation and the involvement of IL-1. Since periodontal bacteria are known to mainly trigger TLR2, the synthetic TLR2 agonist Pam3Cys was used as positive control. *P. gingivalis* and *P. nigrescens* induced Th1 as well as Th17 differentiation in a co-culture of antigen-presenting cells (APCs) and CD4⁺ T cells, as measured by FACS analysis (Fig. 2A). The percentage of Th17 cells was, however, significantly higher than that of Th1, indicating skewing toward Th17 (Fig. 2A). Th17 induction by periodontal bacteria was strongly promoted in the absence of the natural IL-1 inhibitor IL-1Ra by approximately 10 fold (Fig. 2B). This indicated the prominent involvement of IL-1 in Th17 skewing by the periodontal bacteria, which occurred irrespective of their possession of PAD enzyme. Accordingly, the production of IL-17 by anti-CD3 stimulated T cells was considerably enhanced when the co-cultured APCs were triggered by either *P. gingivalis* or *P. nigrescens* and was substantially aggravated by IL-1 (Fig. 2C and D). Both pathogens were relatively weak inducers of Th1 differentiation and IFN γ

production (Fig. 2A-D). IL-1Ra deficiency resulted in an increased Th1 differentiation and IFN γ production as well; however, the final T cell response to periodontal bacteria remained far more in favor of Th17 (Fig. 2A-D). In addition, both bacteria significantly lowered the IL-4 production under autoimmunity-prone IL-1Ra^{-/-} conditions (Fig. 2E).

Th17 induction by periodontal pathogens is dependent on TLR2 expression on APCs. As mentioned above, *P. gingivalis* and *P. nigrescens* have been shown to activate innate immune cells mainly through TLR2 [24]. We investigated the involvement of TLR2 in adaptive T cell response induced by *P. gingivalis* and *P. nigrescens*. Using APCs and T cells derived from single IL-1Ra and double IL-1Ra/TLR2 deficient mice, Th17 induction was found to predominantly depend on TLR2 expression on APCs (Fig. 2F). The induction of Th1 was, however, dependent on TLR2 expression directly on T cells (Fig. 2G). These data point toward a cell-specific involvement of TLR2 in driving the differentiation of either Th1 or Th17 subset upon recognition of periodontal bacteria.

Oral inoculation with living P. gingivalis and P. nigrescens increases the severity of experimental arthritis and induces inflammatory and joint destructing factors. To examine whether periodontal pathogens affect the progression of experimental arthritis *in vivo*, mice immunized with type II collagen received either *P. gingivalis* or *P. nigrescens* orally, as described in Methods. Both bacteria accelerated the disease onset. At day 22, shortly after the last oral inoculation of bacteria, arthritis incidence was higher in bacteria-treated groups (70% for both *P. gingivalis* and *P. nigrescens* groups) compared to the control group (40%). However, disease incidence was similar at the end point (day 30) with 60% for control mice, 70% for *P. gingivalis* and 80% for *P. nigrescens* groups. Importantly, both periodontal pathogens appeared to increase the clinical arthritis scores, although only *P. gingivalis* reached the statistical significance (Fig. 3A). Increased arthritis severity was further reflected in enhanced circulating levels of IL-6 and the keratinocyte-derived chemokine (KC) by both bacteria (Fig. 3B and C). TNF α , as well as T cell cytokines (IL-17 and IFN γ) were not detectable in serum.

In addition, local expression of inflammatory genes in arthritic synovial tissue was enhanced only by *P. gingivalis*. A significant increase of matrix metalloproteinase (MMP) 9 was induced by *P. gingivalis* (Fig. 3D). Furthermore, synovial expression of the osteoclast marker cathepsin K was significantly increased (Fig. 3E). The induction of IL-1 β , IL-6 and MMP3 by *P. gingivalis* did not reach the statistical significance.

Periodontal pathogens specifically induce an IL-17 phenotype in T cells, while reducing IL-4.

To investigate the *in vivo* effect of *P. gingivalis* and *P. nigrescens* on T cell phenotype in the context of arthritis, we analyzed the cytokine profile of T cells from draining lymph nodes of arthritic mice. Upon pan T cell stimulation using anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, increased IL-17 production was found upon inoculation with *P. gingivalis* and *P. nigrescens* compared to the control group (Fig. 4A). IFN γ levels remained unaffected (Fig. 4B). Interestingly, production of IL-4 by T cells was strongly suppressed specifically by *P. nigrescens* (Fig. 4C). This indicates that periodontal pathogens are capable of favoring the Th17 differentiation *in vivo* and *P. nigrescens* can reduce the anti-inflammatory IL-4 response as well. The shift in T cell phenotype was confirmed upon antigen-specific stimulation of T cells with type II collagen (Figures 4D and E), where both *P. gingivalis* and *P. nigrescens* significantly increased IL-17 production without influencing IFN γ . IL-4 levels were very low upon stimulation with collagen (<4 pg/ml), indicating that antigen-specific T cells are not of Th2 type.

With respect to the B cell response, production of IgG1 and IgG2a isotypes directed against type II collagen was not influenced by periodontal pathogens (Fig. S2). Moreover, no antibodies against cyclic citrullinated peptide (CCP)-2, citrullinated fibrinogen, α -enolase and vimentin peptides could be detected in sera of these mice (Fig. S3), indicating that these antibodies could not account for the arthritis phenotype observed.

Co-incident periodontitis significantly increases the severity of bone erosion in arthritic joints, strongly correlated with induced IL-17. Histological analysis of the joints showed that synovial inflammation tended to increase upon oral inoculation of periodontal pathogens; however, statistical significance was not reached ($p=0.22$ for *P. gingivalis* and $p=0.35$ for *P. nigrescens* compared to Control, Fig. 5A). Furthermore, the presence of periodontitis had no apparent effect on the severity of cartilage destruction (Fig. 5B). Interestingly, the severity of bone erosion was substantially increased by inoculations of *P. gingivalis* as well as *P. nigrescens* (Fig. 5C). Representative histological images illustrating increased bone erosion are shown in Fig. 5D. Importantly, the intensity of bone erosion strongly correlated with concentrations of IL-17 induced by *P. gingivalis* and *P. nigrescens*, as measured in cultures of draining lymph node T cells with anti-CD3/CD28 as well as antigen-specific stimulations (Fig. 5 E and F).

Discussion

Citrullinated polypeptides have been suggested as true autoantigens in RA, contributing to the loss of self-tolerance through induction of ACPA [25]. As the epidemiologic evidence for the relationship between RA and PD increases, research has primarily focused on *P. gingivalis* due to its exclusive capability of PAD expression and protein citrullination. Two essential aspects are usually being underestimated in this respect. One is that *P. gingivalis* possesses several other virulence factors such as LPS, fimbriae (Fim) hemagglutinin and gingipains, which may directly contribute to its pathogenicity regardless of citrullination [26-29]. Other is that PD is in fact a polymicrobial disease. Clinical studies have suggested the involvement of periodontal pathogens unable to express PAD enzymes in the pathogenesis of RA, especially *P. intermedia* and *P. nigrescens* [17, 18]. Besides *P. gingivalis* DNA, DNA fragments of these bacteria were also found elevated in RA serum and synovial fluid as well as in subgingival dental plaque of RA patients with periodontitis [17, 18]. In addition, the persistence of *P. gingivalis*, *P. nigrescens* and *P. intermedia* was observed after mechanical periodontal therapy and, interestingly, reminiscent *P. nigrescens* and *P. intermedia* were distributed mostly at bleeding sites [30]. However, despite the clinical evidence suggesting the involvement of *Prevotella* species in RA pathogenesis, *in vivo* studies on the influence of *Prevotella*-associated PD on arthritis and the mechanisms involved are lacking so far.

In the present study, we sought to unravel the influence of *P. gingivalis* on arthritis regardless of its citrullination capability, while using *P. nigrescens* as a periodontal pathogen lacking citrullinating capacity. In the context of a direct role of innate immune response to pathogens in instructing the T cell response, we here demonstrate DC activation and a clear skewing toward Th17 cells by both *P. gingivalis* and *P. nigrescens*, while reducing IL-4. Th17 cells have recently emerged as major pathogenic cells in autoimmune diseases including RA, where they can specifically be induced by activated monocytes within the inflamed joints [31, 32]. Both DC and Th17 responses to these periodontal pathogens were substantially enhanced in cells from autoimmune prone mice lacking endogenous IL-1 receptor antagonist [33]. TLR2 has been described as the main APC receptor responsible for the innate response to *P. gingivalis* and *P. nigrescens* [24, 29]. However, with respect to T cell response, TLR2 is also expressed directly on T cells where it plays an important role in proliferation and function of regulatory T (Treg) cells [5, 34, 35]. Our data indicates that both *P. gingivalis* and *P. nigrescens* require TLR2 on APCs for the

induction of Th17 cells, but induce Th1 using TLR2 directly expressed on T cells. Therefore, the presence of distinct cell populations expressing TLR2 at the site of interaction may affect the ultimate T cell profile both *in vitro* and *in vivo*. The direct activation of TLR2 on T cells by periodontal pathogens to induce Th1 is an interesting finding, as the main effect of TLRs on T cell balance is thought to be a consequence of TLR activation on APCs [36, 37]. In addition, the role of TLR2 in Treg induction may explain the apparent increase of Th17 cells in conditions in which T cells lack TLR2 (Fig. 2F).

Our *in vivo* studies revealed the modulation of T cell phenotype in the context of arthritis as a relevant pathogenic characteristic of periodontal bacteria, with a significant impact on bone erosion. This effect appears to be independent of ACPA induction or possession of citrullinating enzymes, since both bacteria had similar effects in this respect. Furthermore, antibodies against several prominent citrullinated peptides were not induced by *P. gingivalis* in the experimental setting used. The short interval between the induction of PD and the final assessment of arthritis enabled us to specifically focus on the impact of the bacteria on T cell response and disease progression, irrespective of ACPA production (Supporting data). In addition, the lack of booster injection may have contributed to the lower relevance of B cell response and ACPA generation in our model and may have favored its T cell dependency. The observation that both bacteria could affect bone erosion reinforces the hypothesis that Th17 induction by periodontal pathogens is a relevant aspect of PD-arthritis interaction.

Our data is in line with previous studies describing alteration of T cell profile by periodontal pathogens. Moreover, it has recently been shown that intramucosal inoculation of *P. gingivalis* in naive mice induces Th1 and Th17 differentiation depending on the proteolytic activity of gingipains and the activation of kinin system [27]. In addition, increased mRNA expression of T cell-related transcription factors was shown in submandibular lymph nodes of mice upon co-induction of pristane-induced arthritis (PIA) and *Agregatibacter actinomycetemcomitans*-induced PD [38]. No effect of *A. actinomycetemcomitans* or *P. gingivalis* on PIA severity was found in this study; however influence of *P. gingivalis* on T cell phenotype was not studied.

Aggravation of arthritis by concomitant PD in our model is, nevertheless, in agreement with findings in other experimental PD/RA models. For instance, subcutaneous exposure of DA rats to heat-killed *P. gingivalis* resulted in accelerated onset and increased severity of adjuvant arthritis [22]. Furthermore, oral gavage of living *P. gingivalis* led to more severe passive (anti-

collagen antibody-induced) arthritis, with an increase of local RANKL and serum CRP levels [23].

In the present study we show for the first time that the antigen-specific IL-17 production promoted by periodontal pathogens is directly associated with the severity of bone erosion *in vivo*. Although *in vitro* studies have shown human chondrocyte invasion and apoptosis by *P. gingivalis* directly added to the cell culture [39, 40], neither *P. gingivalis* nor *P. nigrescens* induced additional cartilage destruction *in vivo* when inoculated orally. IL-17 is known as a major factor promoting osteoclastogenesis and bone erosion during collagen-induced arthritis [41]. In synergy with TNF α , IL-17 is capable of inducing cartilage destruction as well [42]. Therefore, the minor effects of periodontal pathogens on cartilage and the prominent impact on bone erosion may be due to the low TNF α -dependency of collagen-induced model [43]. In fact, TNF α could not be detected in the serum of CIA mice even in the presence of *P. gingivalis* or *P. nigrescens* treatments. Understanding the mechanisms underlying the divergent effects of periodontal pathogens on cartilage and bone pathology warrants further investigation. In this regard, a Th17 independent effect of periodontal pathogens on bone homeostasis should also be considered, since a direct TLR2-dependent influence of *P. gingivalis* on osteoclastogenesis has been shown *in vitro* [44].

It is of interest that, despite similar Th17 induction and pathogenicity, *P. gingivalis* and *P. nigrescens* exhibited a number of differential functions *in vivo*. *P. gingivalis*, but not *P. nigrescens*, induced synovial expression of proinflammatory genes including MMP-9 and cathepsin K, possibly stimulated by IL-17 [42, 45]. On the other hand, *P. nigrescens* appeared to be a strong suppressor of the anti-inflammatory (Th2-related) IL-4 production *in vivo*. Suppression of IL-4 production by splenic T cells upon TLR2 triggering is in agreement with a previous study in which the TLR2 agonist zymosan was injected into SKG mice spontaneously developing arthritis [46]. Therefore, *P. gingivalis* seems to have a more local effect through an initial Th17/IL-17 induction in the lymph nodes and subsequent production of other local inflammatory mediators involved in osteoclast differentiation and activity. In contrast, *P. nigrescens* may play a more systemic role, modulating the T cell phenotype by reducing Th2 response, while favoring the Th17 differentiation.

Taken together, this study provides the first evidence for the modulation of T cell phenotype, in particular Th17 induction, as a relevant pathogenic characteristic of periodontal pathogens

irrespective of ACPA induction. The data further support the relevance of periodontal bacteria in the pathogenesis of arthritis, especially with respect to bone erosion. Differential mechanisms and possibly distinct bacteria-host interfaces for *P. gingivalis* and *P. nigrescens* are suggested; however, further investigation is required to unravel these processes.

Methods

Induction of collagen-induced arthritis (CIA) and experimental periodontitis. Bovine type II collagen was dissolved in 0.05 M acetic acid to a concentration of 0.5 mg/ml and emulsified in an equal volume of Freund's complete adjuvant containing 0.5 mg/ml *M. tuberculosis* H37Ra (Difco laboratories, USA). Male 10-12 weeks old DBA-1 mice (Janvier, France) were immunized by intradermal injection of 100 μ l of the emulsion at the tail base. Experimental periodontitis was induced by oral inoculation of 1×10^8 CFU of *P. gingivalis* ATCC 33277 or *P. nigrescens* 33563 (anaerobically grown on supplemented blood agar) diluted in 75 μ l of phosphate-buffered saline containing 2% carboxymethylcellulose at days 14, 16, 18, 20 and 22. Control group received 2% carboxymethylcellulose alone.

Arthritis was macroscopically scored by two blinded observers on a 0-2 scale per paw as described previously [43]. For histological analysis, ankle joints isolated at day 30 were fixed in 4% formaldehyde for 4 days, then decalcified in 5% formic acid and embedded in paraffin. Tissue sections of 7 μ m were stained with Hematoxylin & Eosin to study synovial inflammation or with safranin O to determine cartilage and bone destruction. Each parameter was scored on a scale from 0 to 3 by two independent observers in a blinded manner.

Generation and maturation of bone marrow-derived DCs (BMDCs). Bone marrow cells were isolated from 5-6 weeks old Balb/c wildtype and IL-1Ra^{-/-} mice (kindly provided by Dr. M. Nicklin, Sheffield, UK) without arthritis and cultured for 9 days with 20 ng/ml GM-CSF (R&D). DC phenotype was controlled by FACS using anti-CD11c-APC antibodies (BD-Pharmingen). For DC maturation and cytokine production, 1×10^5 immature DCs were incubated with 100 ng/ml purified E. coli LPS and heat-killed (30 min at 60 °C) *P.gingivalis* or *P.nigrescens* (10^7 CFU/well) for 24 hours. DC maturation was determined by measuring the upregulation of MHC class II and CD86 markers using anti-MHCII-FITC (BMA Biomedicals) and anti-CD86-PE (BD-Pharmingen) FACS antibodies.

Culture and analysis of T lymphocytes. Splenic T cells and APCs were isolated from non-arthritic BALB/c and IL-1Ra^{-/-} (also TLR2^{-/-} where mentioned) mice using magnetic cell sorting (MACS, Miltenyi Biotec). CD4⁺ effector T cells (50,000/well) and 30 Gy-irradiated CD4⁻ cells (150,000/well as APCs) were cultured in the presence of plate-coated anti-CD3 (2 μ g/ml, R&D) and TGF- β (10 ng/ml), and either Pam3Cys (1 μ g/ml, EMC Microcollections), heat killed *P.*

gingivalis or *P. nigrescens* (10^7 CFU/well each) for 72 hours. For FACS analysis, cells were stimulated with phorbol myristate acetate (PMA, 50 ng/ml, Sigma), ionomycin (1 μ g/ml, Sigma) and the Golgi-traffic inhibitor Brefeldin (1 μ l/ml, BD Biosciences) for additional 4 hours. T cell differentiation was determined using anti-CD4-APC, anti-IL-17-PE and anti-IFN γ -FITC staining and appropriate isotype-matched control antibodies (all from BD Biosciences-Pharmingen). Cells were analyzed on a FACSCalibur using the CellQuest software (BD Biosciences-Pharmingen).

For analysis of the T cell response during CIA, T cells from popliteal and inguinal lymph nodes (day 30) were cultured (2×10^5 cells/well) in the presence of plate-coated anti-CD3 (1 μ g/ml, R&D) and anti-CD28 (2 μ g/ml, BD Biosciences) or bovine type II collagen (50 μ g/ml) for 96 hours.

Measurement of cytokines. Cytokine and chemokine concentrations in culture supernatants and mice sera were determined using the Milliplex cytokine assays from Millipore following the manufacturer's instruction.

Citrullinated peptide ELISA. Antibodies against an in-house CCP2 peptide and citrullinated (Cit) peptides derived from vimentin (GVYATCitSSAVCitLCitSSVPG), fibrinogen (QMRMELE-CitPGGNEITCitGGSTSYG) and α -enolase (LKIHCitEIFDSCitGNPTV) were determined by ELISA. All peptides were synthesized with a C-terminal spacer and biotin tag. Streptavidin-coated microtiter plates were coated with 10 μ g/ml peptide diluted in PBS/0.1% BSA overnight at 4 °C, then incubated with 100 μ l/well 100x diluted serum for 1 hour at 37 °C. Bound antibodies were detected using rabbit-anti-mouse IgG HRP-conjugated antibody (DAKO, Denmark), followed by visualization with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) solution mixed 1:1 with urea peroxide as substrate. Reaction was stopped using 2 M H₂SO₄ 10 minutes later and optical density was measured at 450 nm.

Isolation of RNA from synovial biopsies. Synovial biopsies from knee joints were isolated from lateral and medial sides of patellae using a 3 mm skin biopsy punch (Stiefel, Germany) at day 30 of CIA. RNA isolation, qPCR analysis, and GAPDH and cathepsin K primer sequences were as described before [47]. The MMP9 primer sequences were as follows: 5'-GGA-ACT-CAC-ACG-

ACA-TCT-TCC-A-3' (forward) and 5'-GAA-ACT-CAC-ACG-CCA-GAA-GAA-TTT-3' (reverse).

Statistical analysis. Group measures are expressed as mean + SEM. Statistical significance was assessed using the two-tailed Mann-Whitney U test to compare two experimental groups and the Kruskal-Wallis test to compare more than 2 groups. Analysis was performed on GraphPad Prism 4.0 software (GraphPad software Inc., USA).

Acknowledgements. We are grateful to Ms. C. Onnekink (Department of Biomolecular Chemistry, Radboud University Nijmegen, The Netherlands) for performing the citrullinated peptide ELISA. This study was performed within the framework of TI Pharma project number D1-101 and was funded by the Netherlands Organization for Scientific Research (VENI grant 916.12.039), the European BTCure IMI program, and by Brazilian agencies CAPES (process: 3758/10-9) and FAPESP (grant #2008/08142-0 and 2009/00341-7).

Figures

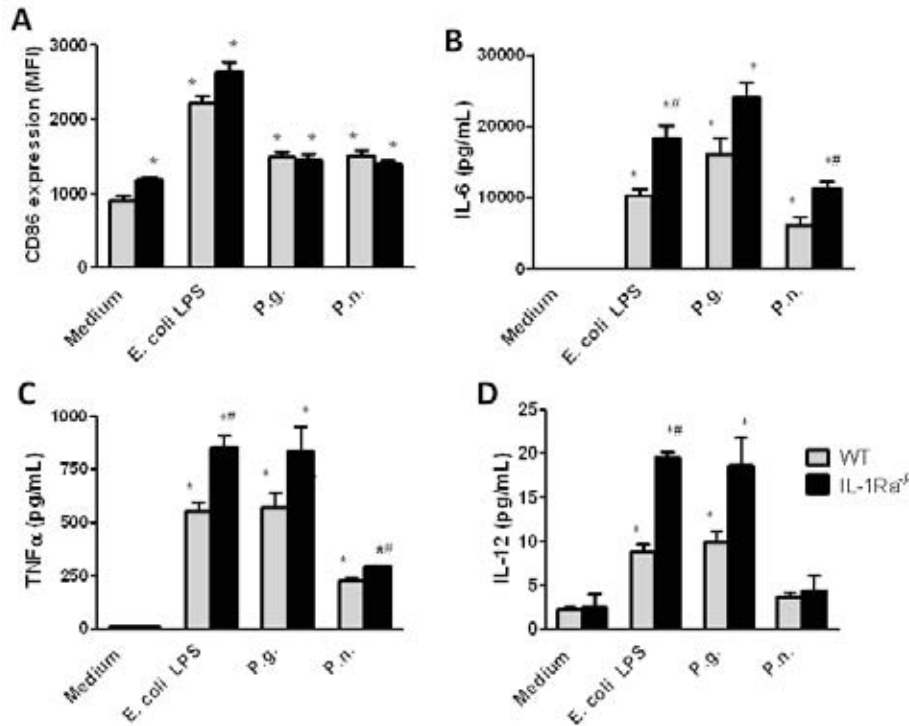


Figure 1. Periodontal pathogens induce maturation and inflammatory cytokine production by DCs, the latter of which is increased by IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) deficiency. Immature bone marrow-derived dendritic cells from WT and IL-1Ra^{-/-} mice were stimulated with *E. coli* LPS (100 ng/ml), heat-killed *P. gingivalis* (*P. g.*) and *P. nigrescens* (*P. n.*, 10⁷ CFU each) for 24 hours. DC maturation was assessed based on CD86 expression on FACS analysis (A). Production of IL-6 (B), TNFα (C) and IL-12 (D) were measured in culture supernatants by Milliplex cytokine measurement kits. N=4 per group. * P < 0.05 vs. medium; # P < 0.05 WT vs. IL-1Ra^{-/-} for each stimulation by the Mann-Whitney U test.

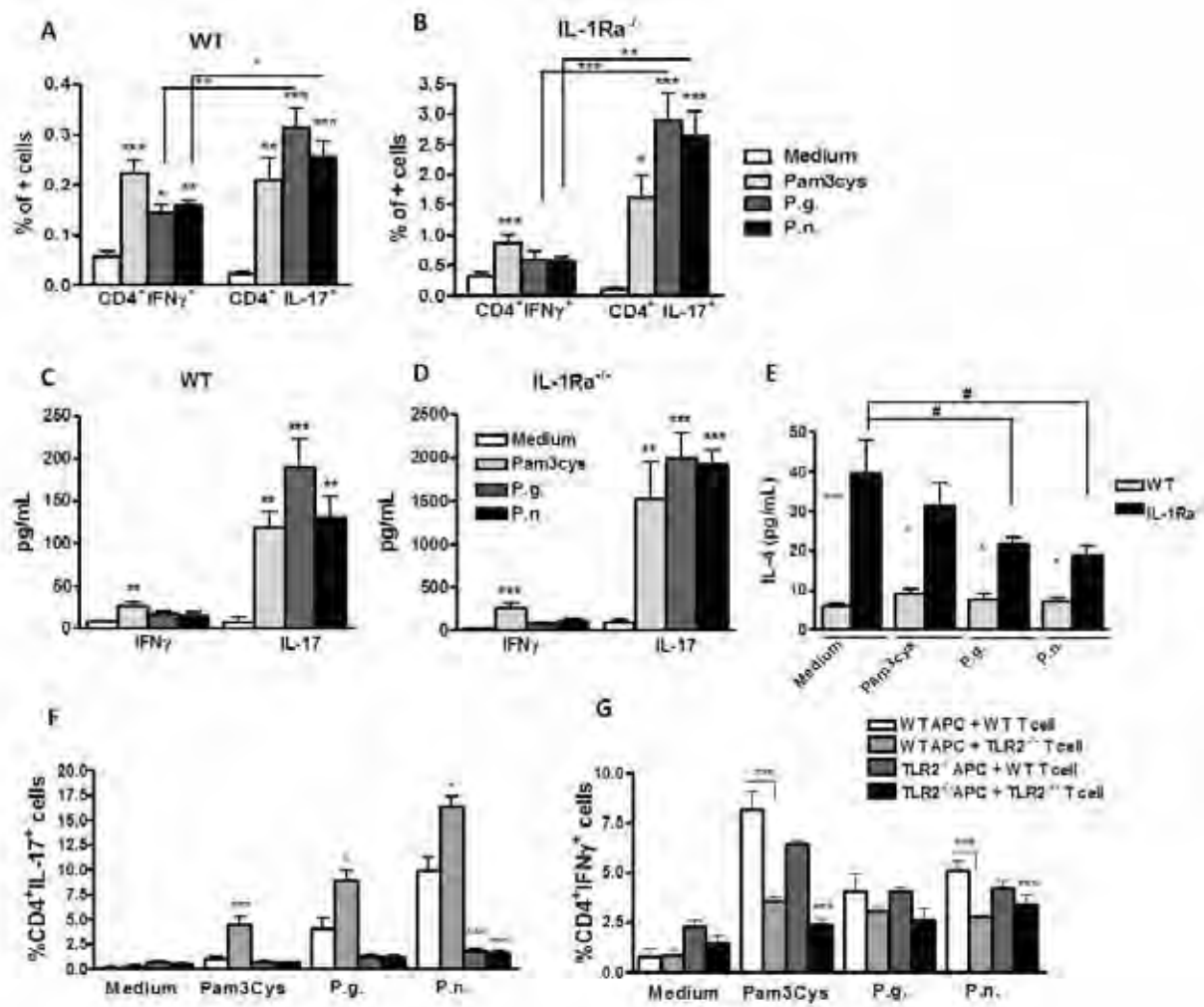


Figure 2. *P. gingivalis* and *P. nigrescens* induce a TLR2-dependent Th17 and to a lesser extent Th1 differentiation, promoted in the absence of IL-1 receptor antagonist. CD4⁺ T cells from WT and IL-1Ra^{-/-} (A-E), as well as IL-1Ra^{-/-} TLR2^{+/+} and IL-1Ra^{-/-} TLR2^{-/-} (F and G) mice were co-cultured with irradiated splenic APCs (1:3 ratio) and stimulated with 10⁷ CFU heat-killed periodontal pathogens in the presence of anti-CD3 antibodies for 72 hours. T helper cell differentiation and cytokine profile were measured by FACS analysis (A, B, F and G) and Milliplex cytokine measurement (C-E). Statistical differences are based on the Mann-Whitney U test: * P < 0.05, ** P < 0.01 and *** P < 0.001 vs. medium or as indicated in (A-D); * P < 0.05 and *** P < 0.001 WT vs. IL-1Ra^{-/-} and # P < 0.05 vs. medium in (E); * P < 0.05 and *** P < 0.001 vs. WT APC + WT T cell condition in (F-G). All cells in F and G are IL-1Ra^{-/-}, and WT refers to TLR2 wild-type.

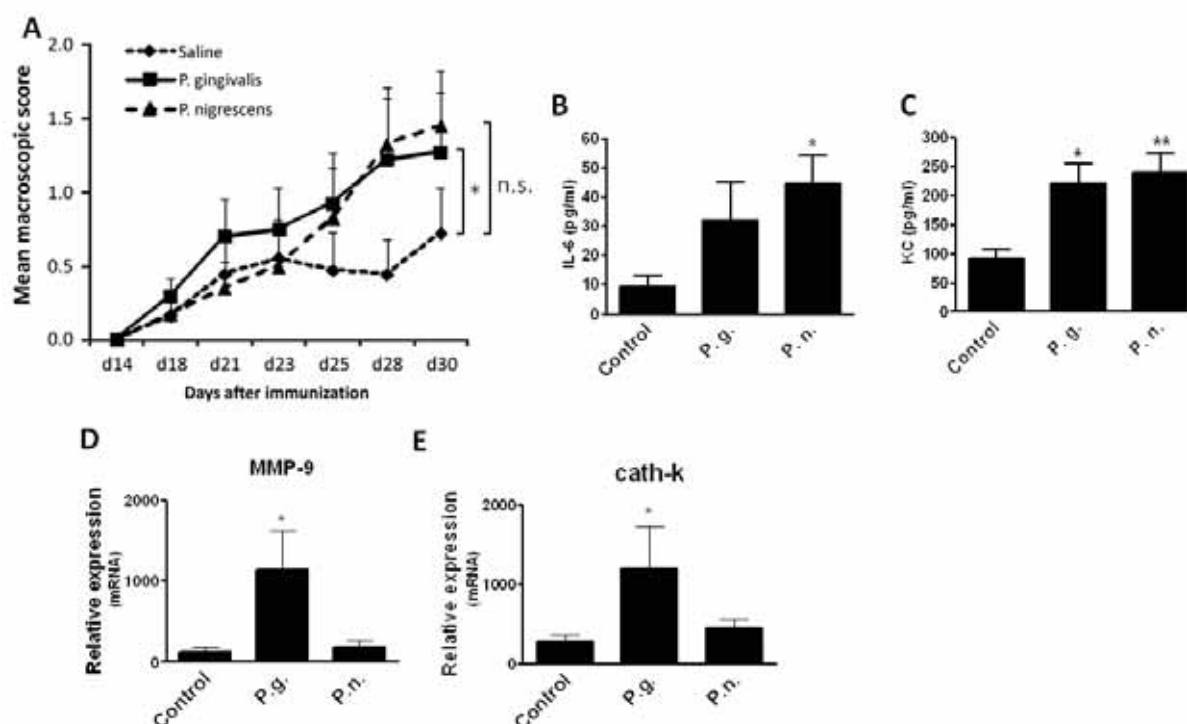


Figure 3. Periodontal pathogens exacerbate experimental arthritis and *P. gingivalis*, but not *P. nigrescens*, induces local expression of proinflammatory genes. Mice with collagen-induced arthritis received five oral inoculations of 10^8 living *P. gingivalis* (*P. g.*) or *P. nigrescens* (*P. n.*), starting at day 14 after immunization with type II collagen. Increased clinical scores of arthritis (shown as mean + SEM) was found upon bacterial treatment mainly by *P. gingivalis* (A). Increased serum levels of IL-6 (B) and KC (C) at day 30 of arthritis measured by Milliplex. Synovial biopsies of the ankle joints of arthritic mice were collected at the end point, RNA was isolated and gene expression was measured by quantitative real-time PCR; mRNA expression of MMP9 (D) and cathepsin K (E) are shown as relative expressions compared to GAPDH ($2^{-\Delta C_t} \times 10^4$). N = 9-10 mice per group. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. control by the Mann-Whitney U test; n.s. = not significant.

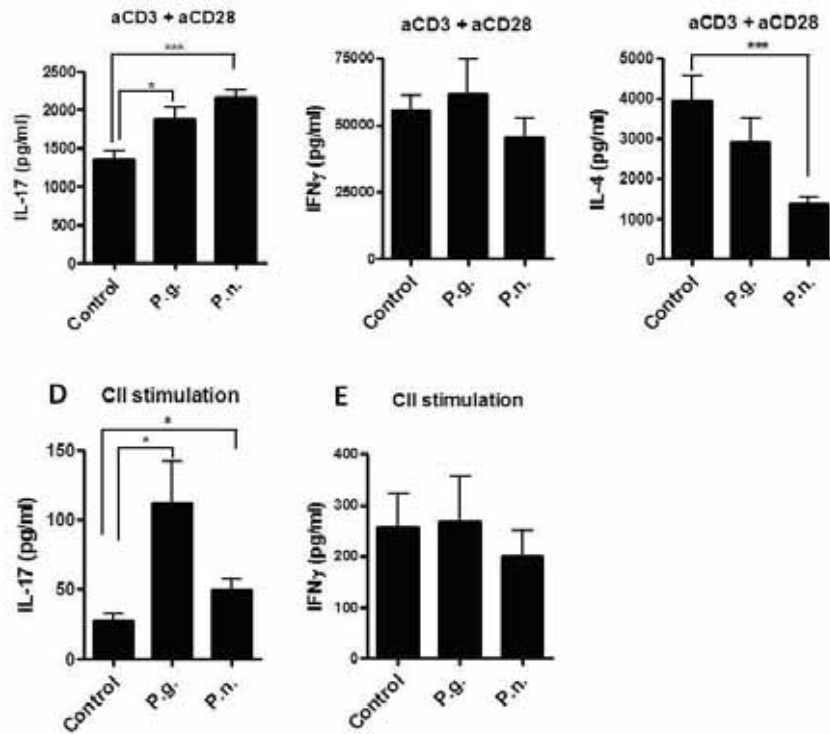


Figure 4. Periodontal pathogens induce Th17 differentiation and *P. nigrescens*, but not *P. gingivalis*, suppresses T cell IL-4 production *in vivo*. (A-E) Lymph node T cells from CIA arthritic mice of control, *P. gingivalis* and *P. nigrescens*-treated groups were stimulated with either anti-CD3 + anti-CD28 antibodies or with type II collagen (CII) as the specific antigen for 72 hours. T cell phenotype was assessed by measuring the prototypic T helper cytokines in culture supernatants by the Milliplex kits. N = 9-10 mice per group. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ by the Mann-Whitney U test.

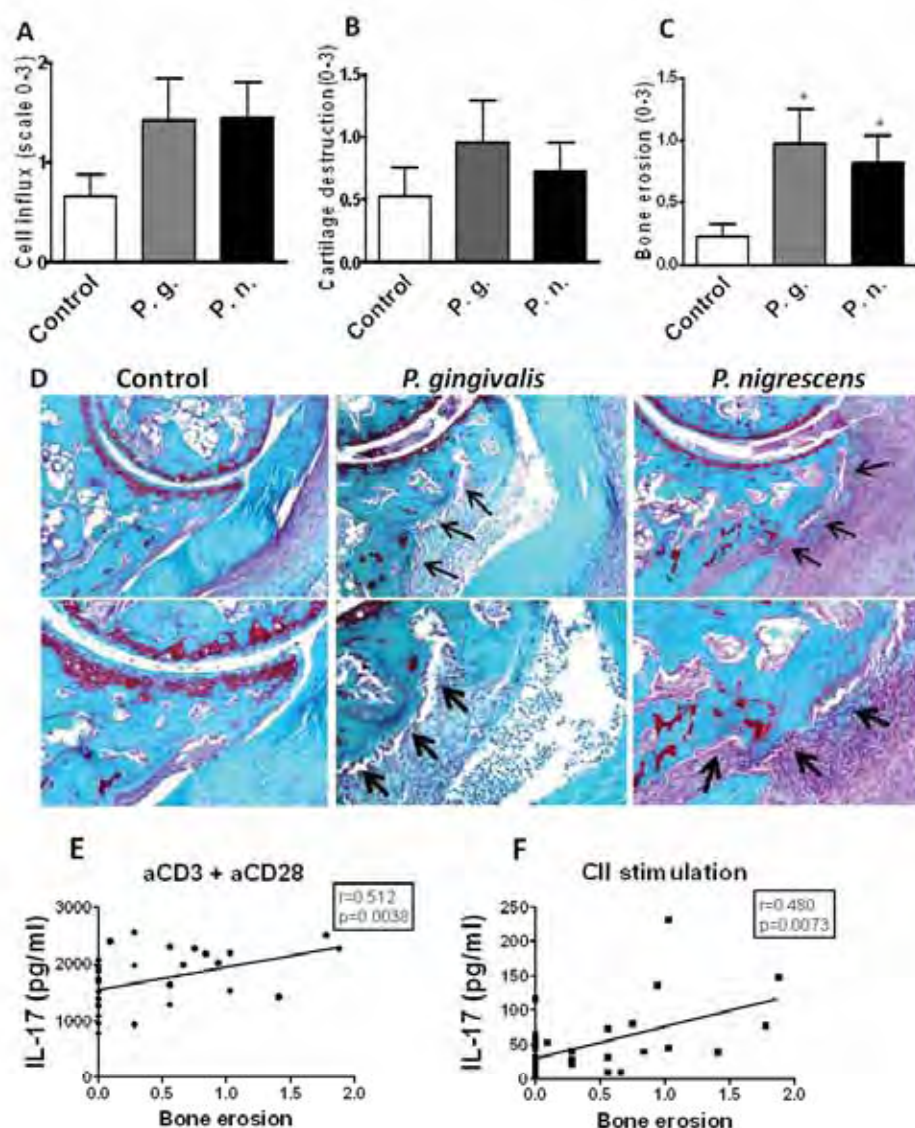


Figure 5. Periodontal pathogens exacerbate arthritic bone erosion, an effect strongly correlated with IL-17 production. (A-C) Histological assessment of the ankle joints at day 30 after immunization. Joint inflammation (A) was scored on Hematoxylin & Eosin-stained tissue sections. Cartilage destruction (B) and bone erosion (C) were scored on Safranin O-stained sections. Data are mean + SEM (scale 0-3) of 9-10 mice per group. * $P < 0.05$ vs. Control by the Mann-Whitney U test; *P. g.* = *P. gingivalis* and *P. n.* = *P. nigrescens*. (D) Representative images of safranin O-stained ankle joint sections illustrating increased arthritic bone erosion by periodontal pathogens. Original magnification x100 in the upper and x200 in the lower panel. (E-F) Correlation between the intensity of arthritic bone erosion and IL-17 production by lymph

node T lymphocytes stimulated with anti-CD3 + anti-CD28 or type II collagen (CII). The Spearman's correlation coefficient (r) and P value is shown at the top right of the figure.

Supporting Figures

Figure S1. Similar maturation and IL-1 β production in WT and IL-1Ra^{-/-} DCs upon stimulation by periodontal pathogens. Immature bone marrow-derived dendritic cells from WT and IL-1Ra^{-/-} mice were stimulated with *E. coli* LPS (100 ng/ml), heat-killed *P. gingivalis* (*P. g.*) and *P. nigrescens* (*P. n.*, 10⁷ CFU each) for 24 hours. DC maturation was assessed based on CD40 expression (A) on FACS analysis. Production of IL-1 β (B) was measured by Milliplex kits. N=4 per group. * P < 0.05 vs. medium by the Mann-Whitney U test.

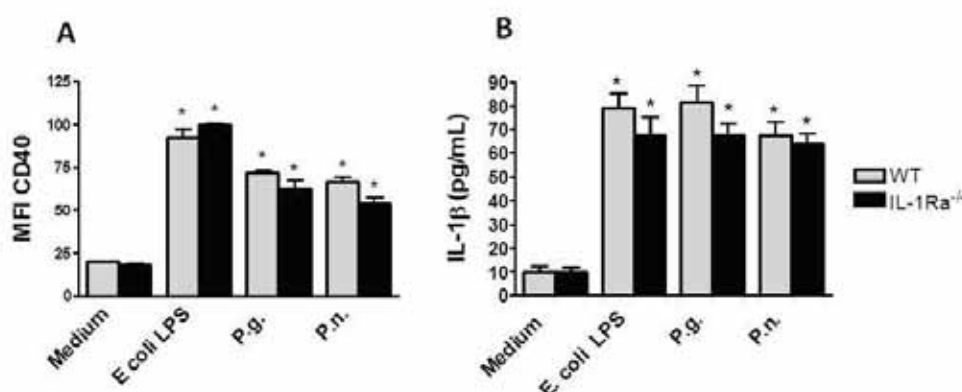


Figure S2. Periodontal pathogens do not affect production of anti-type II collagen antibodies during experimental arthritis. Mice with collagen-induced arthritis received five oral inoculations of 10⁸ living *P. gingivalis* (*P. g.*) or *P. nigrescens* (*P. n.*), starting at day 14 after immunization with type II collagen. Anti-collagen II IgG1 (A) and IgG2a (B) antibodies were measured in serum by ELISA. Mean $\pm$ SEM of 9-10 mice per group is shown. Sera of a non-immunized mouse and of an arthritic mouse were included as negative and positive controls, respectively.

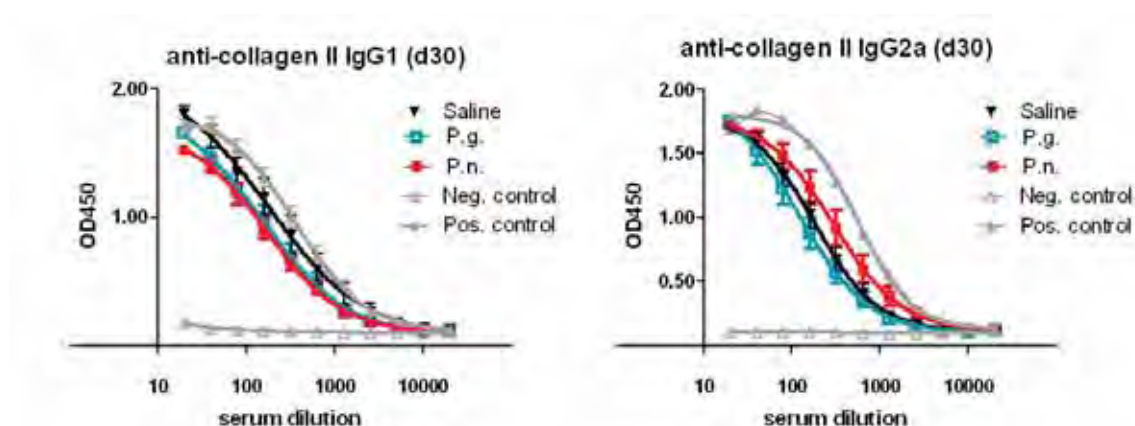
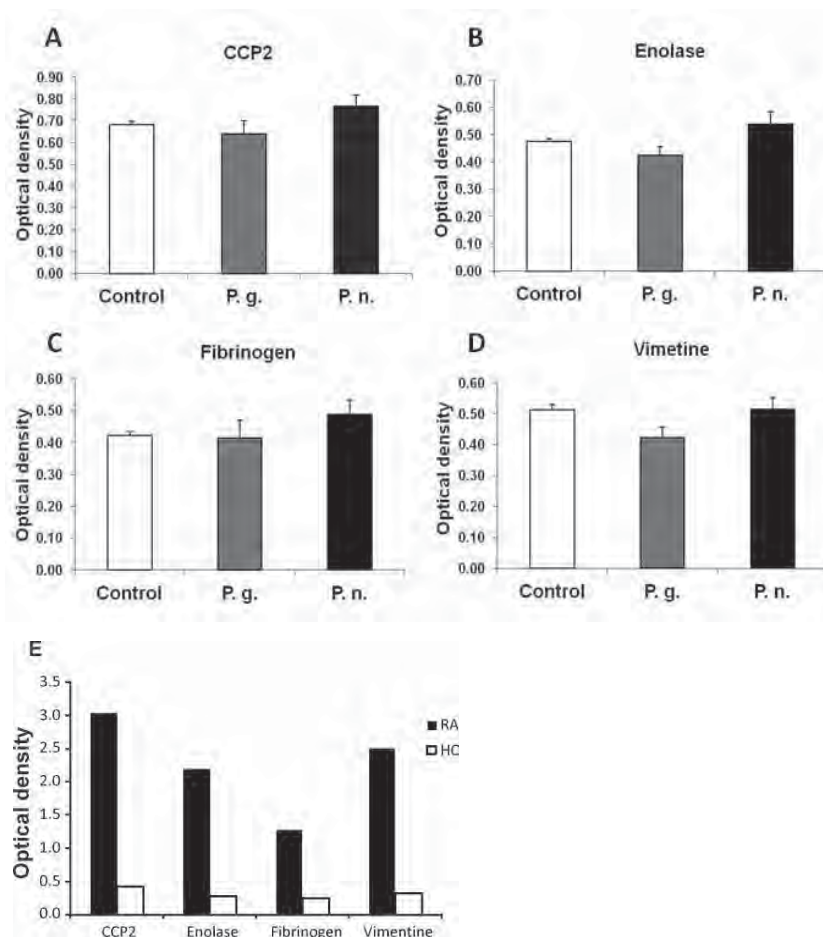


Figure S3. Periodontal pathogens did not induce major anti-cyclic citrullinated peptide antibodies (ACPA) in the time frame of 16 days after the first inoculation. Mice with collagen-induced arthritis received five oral inoculations of 10^8 living *P. gingivalis* or *P. nigrescens* every other day, starting at day 14 after immunization with type II collagen. ACPA against a CCP2 peptide (A) and citrullinated α -enolase (B), fibrinogen (C) and vimentin (D) peptides were measured in mice sera 16 days later at the endpoint of the experiment (day 30 of arthritis) by ELISA. As positive control serum from a RA patient in comparison with a healthy control (HC) was analyzed in parallel (E).



References

1. Skapenko, A., et al., *The role of the T cell in autoimmune inflammation*. Arthritis Res Ther, 2005. **7 Suppl 2**: p. S4-14.
2. Lundy, S.K., et al., *Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes*. Arthritis Res Ther, 2007. **9**(1): p. 202.
3. McInnes, I.B. and G. Schett, *The pathogenesis of rheumatoid arthritis*. N Engl J Med. **365**(23): p. 2205-19.
4. Hida, S., et al., *Cell wall beta-glucan derived from Candida albicans acts as a trigger for autoimmune arthritis in SKG mice*. Biol Pharm Bull, 2007. **30**(8): p. 1589-92.
5. Abdollahi-Roodsaz, S., et al., *Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis*. J Clin Invest, 2008. **118**(1): p. 205-16.
6. Wu, H.J., et al., *Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells*. Immunity. **32**(6): p. 815-27.
7. Andreaskos, E., et al., *The toll-like receptor-nuclear factor kappaB pathway in rheumatoid arthritis*. Front Biosci, 2005. **10**: p. 2478-88.
8. Corr, M., *The tolls of arthritis*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(8): p. 2233-6.
9. de Pablo, P., et al., *Periodontitis in systemic rheumatic diseases*. Nat Rev Rheumatol, 2009. **5**(4): p. 218-24.
10. Bartold, P.M., R.I. Marshall, and D.R. Haynes, *Periodontitis and rheumatoid arthritis: a review*. J Periodontol, 2005. **76**(11 Suppl): p. 2066-74.
11. Mercado, F., et al., *Is there a relationship between rheumatoid arthritis and periodontal disease?* J Clin Periodontol, 2000. **27**(4): p. 267-72.
12. Mercado, F.B., et al., *Relationship between rheumatoid arthritis and periodontitis*. J Periodontol, 2001. **72**(6): p. 779-87.
13. Al-Shammari, K.F., et al., *Risk indicators for tooth loss due to periodontal disease*. J Periodontol, 2005. **76**(11): p. 1910-8.
14. Ribeiro, J., A. Leao, and A.B. Novaes, *Periodontal infection as a possible severity factor for rheumatoid arthritis*. J Clin Periodontol, 2005. **32**(4): p. 412-6.
15. Al-Katma, M.K., et al., *Control of periodontal infection reduces the severity of active rheumatoid arthritis*. J Clin Rheumatol, 2007. **13**(3): p. 134-7.
16. Ortiz, P., et al., *Periodontal therapy reduces the severity of active rheumatoid arthritis in patients treated with or without tumor necrosis factor inhibitors*. J Periodontol, 2009. **80**(4): p. 535-40.
17. Moen, K., et al., *Synovial inflammation in active rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis facilitates trapping of a variety of oral bacterial DNAs*. Clin Exp Rheumatol, 2006. **24**(6): p. 656-63.
18. Martinez-Martinez, R.E., et al., *Detection of periodontal bacterial DNA in serum and synovial fluid in refractory rheumatoid arthritis patients*. J Clin Periodontol, 2009. **36**(12): p. 1004-10.
19. Lundberg, K., et al., *Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection*. Nat Rev Rheumatol. **6**(12): p. 727-30.
20. Wegner, N., et al., *Peptidylarginine deiminase from Porphyromonas gingivalis citrullinates human fibrinogen and alpha-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum. **62**(9): p. 2662-72.

21. Hueber, W., et al., *Proteomic analysis of secreted proteins in early rheumatoid arthritis: anti-citrulline autoreactivity is associated with up regulation of proinflammatory cytokines*. Ann Rheum Dis, 2007. **66**(6): p. 712-9.
22. Bartold, P.M., et al., *Effect of Porphyromonas gingivalis-induced inflammation on the development of rheumatoid arthritis*. J Clin Periodontol. **37**(5): p. 405-11.
23. Cantley, M.D., et al., *Pre-existing periodontitis exacerbates experimental arthritis in a mouse model*. J Clin Periodontol. **38**(6): p. 532-41.
24. Kikkert, R., et al., *Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria*. Oral Microbiol Immunol, 2007. **22**(3): p. 145-51.
25. Wegner, N., et al., *Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis*. Immunol Rev. **233**(1): p. 34-54.
26. Hajishengallis, G., P. Ratti, and E. Harokopakis, *Peptide mapping of bacterial fimbrial epitopes interacting with pattern recognition receptors*. J Biol Chem, 2005. **280**(47): p. 38902-13.
27. Monteiro, A.C., et al., *Kinin danger signals proteolytically released by gingipain induce Fimbriae-specific IFN-gamma- and IL-17-producing T cells in mice infected intramucosally with Porphyromonas gingivalis*. J Immunol, 2009. **183**(6): p. 3700-11.
28. Hajishengallis, G., et al., *Pathogen induction of CXCR4/TLR2 cross-talk impairs host defense function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(36): p. 13532-7.
29. Martin, M., et al., *Role of the phosphatidylinositol 3 kinase-Akt pathway in the regulation of IL-10 and IL-12 by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide*. J Immunol, 2003. **171**(2): p. 717-25.
30. Mombelli, A., et al., *Persistence patterns of Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia/nigrescens, and Actinobacillus actinomyetemcomitans after mechanical therapy of periodontal disease*. J Periodontol, 2000. **71**(1): p. 14-21.
31. Evans, H.G., et al., *In vivo activated monocytes from the site of inflammation in humans specifically promote Th17 responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(15): p. 6232-7.
32. Gaffen, S.L., *The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Curr Rheumatol Rep, 2009. **11**(5): p. 365-70.
33. Ishigame, H., et al., *The role of TNFalpha and IL-17 in the development of excess IL-1 signaling-induced inflammatory diseases in IL-1 receptor antagonist-deficient mice*. Ernst Schering Res Found Workshop, 2006(56): p. 129-53.
34. Liu, H., et al., *Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+ CD25+ regulatory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(18): p. 7048-53.
35. Suttmoller, R.P., et al., *Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells*. J Clin Invest, 2006. **116**(2): p. 485-94.
36. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
37. Kopp, E. and R. Medzhitov, *Recognition of microbial infection by Toll-like receptors*. Curr Opin Immunol, 2003. **15**(4): p. 396-401.
38. Trombone, A.P., et al., *Periodontitis and arthritis interaction in mice involves a shared hyper-inflammatory genotype and functional immunological interferences*. Genes Immun. **11**(6): p. 479-89.
39. Pischon, N., et al., *Effects of Porphyromonas gingivalis on cell cycle progression and apoptosis of primary human chondrocytes*. Ann Rheum Dis, 2009. **68**(12): p. 1902-7.

40. Rohner, E., et al., *Induced apoptosis of chondrocytes by Porphyromonas gingivalis as a possible pathway for cartilage loss in rheumatoid arthritis*. *Calcif Tissue Int.* **87**(4): p. 333-40.
41. Lubberts, E., et al., *IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance*. *J Immunol*, 2003. **170**(5): p. 2655-62.
42. Koenders, M.I., et al., *Tumor necrosis factor-interleukin-17 interplay induces S100A8, interleukin-1beta, and matrix metalloproteinases, and drives irreversible cartilage destruction in murine arthritis: rationale for combination treatment during arthritis*. *Arthritis Rheum.* **63**(8): p. 2329-39.
43. Joosten, L.A., et al., *Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra*. *Arthritis Rheum*, 1996. **39**(5): p. 797-809.
44. Zhang, P., et al., *TLR2-dependent modulation of osteoclastogenesis by Porphyromonas gingivalis through differential induction of NFATc1 and NF-kappaB*. *J Biol Chem.* **286**(27): p. 24159-69.
45. Zhang, F., et al., *Interleukin-17A induces cathepsin K and MMP-9 expression in osteoclasts via celecoxib-blocked prostaglandin E2 in osteoblasts*. *Biochimie.* **93**(2): p. 296-305.
46. Kobayashi, K., et al., *Cytokine production profile of splenocytes derived from zymosan A-treated SKG mice developing arthritis*. *Inflamm Res*, 2006. **55**(8): p. 335-41.
47. Abdollahi-Roodsaz, S., et al., *Local interleukin-1-driven joint pathology is dependent on toll-like receptor 4 activation*. *Am J Pathol*, 2009. **175**(5): p. 2004-13.

Discussão

A associação entre as doenças periodontais (DP) e artrite reumatóide (AR) tem sido cada vez mais alvo de investigação científica, fato este justificado por serem essas duas desordens de caráter inflamatório crônico e compartilharem diversas semelhanças fisiopatológicas relacionadas, sobretudo, a alterações no perfil e níveis de citocinas e de seus antagonistas ^{8, 16}. Assim, este desequilíbrio imuno-inflamatório é responsável pela maior parte do dano tecidual observado na progressão dessas doenças. Neste contexto, é indiscutível o papel crucial desempenhado por Th17 em conjunto com a significativa participação de citocinas pró-inflamatórias na destruição da cartilagem e do tecido ósseo articular, sobretudo nos estágios iniciais da doença ^{52, 74}. Entretanto, os eventos e/ou agentes envolvidos em promover esse desequilíbrio da resposta imune/inflamatória e assim, a diferenciação e expansão daquele tipo celular na AR, ainda não são completamente conhecidos. Nesse contexto, após a descoberta dos receptores Toll no tecido articular de pacientes com AR, a suspeita do envolvimento de agentes infecciosos na etiologia da AR ganhou força e a participação de periodontopatógenos na patogênese da AR tem sido amplamente investigada ^{5, 14, 16, 58, 61}. Entretanto, a maior parte das pesquisas neste campo concentra-se no papel de *P. gingivalis* como agente causal na AR devido à exclusiva capacidade desta bactéria entre os procariotos em expressar enzimas denominadas PADs (*peptidil arginine deiminases*), as quais promovem a citrulinação de peptídios através de uma modificação translacional, sendo estes posteriormente reconhecidos pelo hospedeiro como antígenos, gerando assim a produção de ACPA (*anti-citrullinated protein antibodies*) e a amplificação da resposta humoral na AR ^{51, 54, 70, 80}. Entretanto, é importante lembrar que *P. gingivalis* possui diversos outros fatores de virulência

estruturais como fímbria, hemaglutinina, hemolisina, além do LPS, bem como produtos do metabolismo, entre eles potentes enzimas proteolíticas como as gingipaínas^{15, 25, 64}. Portanto, nós sugerimos que *P. gingivalis* pode participar na progressão da AR através de outros mecanismos além da indução de ACPA. Essa hipótese é reforçada por evidências clínicas que sugerem a participação de outros periodontopatógenos não produtores de PADs na AR, entre eles *P. intermedia* e *P. nigrescens*. Alguns trabalhos detectaram a presença de DNA de *P. gingivalis* e destes periodontopatógenos no tecido sinovial e soro de pacientes com AR bem como na bolsa periodontal de pacientes com AR^{57, 62}. Além disso, a persistência de *P. gingivalis*, *P. nigrescens* e *P. intermedia* foi observada após a terapia mecânica periodontal, sendo que *P. nigrescens* e *P. intermedia* remanescentes foram encontrados em um maior número de sítios, principalmente associado à sangramento gengival, enquanto *P. gingivalis* foi detectado em um menor número de sítios, porém com maior profundidade de sondagem⁶³. Apesar das evidências clínicas, os mecanismos pelos quais esses microrganismos podem atuar na patogênese da AR ainda são desconhecidos devido a inexistência de estudos em modelo animal empregando *P. intermedia* ou *P. nigrescens* como modelos de indução de DP, contrariamente à *P. gingivalis*, que apresenta uma vasta literatura empregando a infecção oral com *P. gingivalis* como modelo de indução de perda óssea alveolar. Uma vez concretizada a colonização subgengival, as alterações histopatológicas verificadas no periodonto de proteção e de sustentação de roedores é semelhante à que ocorre em humanos, o que justifica segundo alguns autores o uso da inoculação de *P. gingivalis* como um modelo viável para o estudo da doença periodontal^{20, 66}.

Dessa forma, optamos investigar inicialmente o efeito da infecção oral com *P. gingivalis* na artrite induzida por antígeno (AIA) e , na segunda etapa das investigações, no intuito de elucidar mecanismos de ação dos periodontopatógenos independentes da produção de ACPA, decidimos utilizar *P. nigrescens* como um controle negativo em relação à presença de PADs e produção de ACPA.

Assim, na indução simultânea da AIA e inoculação oral de *P. gingivalis*, observamos inicialmente que a AIA não agravou a perda óssea alveolar induzida por *P. gingivalis*, enquanto um maior dano articular foi promovido por *P. gingivalis* na AIA. Este efeito de *P. gingivalis* na aceleração e aumento da severidade da artrite está de acordo com os resultados de estudos recentes realizados em diferentes modelos experimentais que demonstraram a influência de *P. gingivalis* no dano aticular sobretudo em níveis macroscópico e histopatológico, além do aumento da expressão local de RANK-L^{7, 12}. No entanto, ainda não se sabe exatamente como *P. gingivalis* promove esta alteração na progressão da artrite. Em nosso estudo, demonstramos inicialmente que *P. gingivalis* atua sobre a patogênese da AIA promovendo um aumento da hipernocicepção mecânica induzida por mBSA e que este evento está possivelmente relacionado ao aumento dos níveis articulares de TNF- α e IL-17 induzido por *P. gingivalis*, visto que estas citocinas apresentam um comprovado efeito pro-nociceptivo na AIA⁶⁷. Além disso, verificamos um aumento não apenas nos níveis locais de IL-17, bem como do percentual de células Th17 nos linfonodos drenantes articulares induzido por *P. gingivalis* na AIA. Assim, na primeira etapa desse estudo demonstramos a influência de *P. gingivalis* na patogênese da AIA, com a importante participação de Th17 e IL-17 neste processo, enquanto a AIA não aumentou a perda

óssea alveolar induzida por *P. gingivalis*. No entanto, os mecanismos envolvidos na indução de Th17 e o papel de TLRs nesse processo é desconhecido. A partir desses resultados, decidimos investigar melhor o efeito da DP experimental na progressão da artrite utilizando diferentes modelos experimentais, bem como investigar in vitro os mecanismos envolvidos no processo de indução de Th17. Assim, considerando a natureza polimicrobiana da DP, bem como a possível influência de distintos periodontopatógenos na progressão da AR, com a capacidade ou não da produção de ACPAs via PADs, optamos por investigar o papel de *P. gingivalis* (produtor de PADs) e de *P. nigrescens* (não produtor de PADs) na modulação do perfil de células T in vitro e, em seguida, na severidade da CIA in vivo, com foco especial na modulação do fenótipo de células T nesses animais frente à infecção com *P. gingivalis* e *P. nigrescens*. Para isto, iniciamos os experimentos desta segunda etapa de investigação utilizando células de camundongos deficientes para antagonista do receptor de IL-1 (IL-1 $R\alpha^{-/-}$). Estes animais desenvolvem artrite espontaneamente devido à excessiva sinalização de IL-1 e este modelo apresenta um caráter autoimune, com patologia semelhante à da AR e é sobretudo mediado por células T, com importante papel de Th17 e dependência de TNF- α e IL-17^{27, 36, 65}. Além disso, foi observado neste modelo o desenvolvimento espontâneo da artrite mediado pela ativação de TLRs e participação de Th17, demonstrando a influência do ambiente microbiano no desenvolvimento da doença¹. Assim, considerando a dependência de TLR/Th17 no desenvolvimento da artrite no modelo de IL-1 $R\alpha^{-/-}$ e a importância de IL-1 para a ativação de células dendríticas, investigamos inicialmente se os periodontopatógenos promovem a maturação e produção de citocinas relacionadas com a diferenciação de células T em

células dendríticas diferenciadas da medula de animais WT e IL-1 Ra^{-/-}. Verificamos in vitro que *P. gingivalis* e *P. nigrescens* ativam em células dendríticas a produção de citocinas pró-inflamatórias capazes de influenciar no fenótipo de células T. Apesar da semelhante maturação, maiores níveis de IL-6 e TNF- α foram induzidos por *P. gingivalis* em células dendríticas WT e IL-1Ra^{-/-}, sugerindo um maior efeito de *P. gingivalis* nestas células quando comparado à *P. nigrescens*. Além disso, níveis muito reduzidos de IL-12, relacionada com o desenvolvimento de um padrão Th1, foram produzidos na presença de ambos *P. gingivalis* e *P. nigrescens*. Assim, considerado este perfil pró-inflamatório de citocinas promovido por *P. gingivalis* e *P. nigrescens*, investigamos em seguida a participação destes patógenos diretamente na diferenciação de células T in vitro e observamos que *P. gingivalis* e *P. nigrescens* induziram uma significativa diferenciação de Th17 e produção de IL-17 quando comparado à Th1 e IFN γ , sendo que este efeito foi aumentado na ausência do antagonista endógeno do receptor de IL-1. Além disso, *P. nigrescens* reduziu de forma significativa os níveis de IL-4 in vitro. Outro importante assunto abordado e investigado em nosso estudo foi a participação dos receptores Toll neste processo de modulação do fenótipo de células T por *P. gingivalis* e *P. nigrescens*. Neste contexto, o reconhecimento de patógenos gram-negativos pelo sistema imune inato é geralmente atribuído à ativação de TLR4; entretanto, este é um tópico bastante controverso na literatura, sobretudo em relação à sinalização de *P. gingivalis* que é relatada ser mediada por TLR2 e/ou 4^{15, 55, 84, 87}. Recentemente tem sido demonstrado que periodontopatógenos gram negativos, entre eles *P. gingivalis* e *P. nigrescens* ativam as células do sistema imune inato sobretudo via TLR2^{34, 56}. Assim, resolvemos investigar

o envolvimento de TLR2 e/ou TLR4 na resposta imune adaptativa induzida por *P. gingivalis* e *P. nigrescens* e nossos dados revelaram um envolvimento diferencial de TLR2 no fenótipo de células T induzido por *P. gingivalis* e *P. nigrescens* em co-cultura de células apresentadoras de antígenos (APCs) e células T. Interessantemente, o padrão Th17 predominante induzido por ambos os periodontopatógenos foi diretamente dependente da ativação de TLR2 nas APCs, enquanto a menor diferenciação de Th1 mostrou-se dependente da expressão de TLR2 nas células T. Esta ativação direta de TLR2 nas células T modulando o fenótipo deste mesmo tipo celular é um achado interessante, considerando que a principal função dos TLRs ocorre de forma indireta, durante a resposta imune inata, através da ativação desses receptores nas APCs, incluindo macrófagos e células dendríticas e esta interação induz então a produção de citocinas que por fim podem afetar o balanço de células T ^{3, 42}. Neste contexto, observamos conforme demonstrado previamente, que *P. gingivalis* e *P. nigrescens* de fato ativam a produção de citocinas proinflamatórias capazes de influenciar no fenótipo de células T em células dendríticas, possivelmente via TLR2. Dessa forma, após a verificação da influência de *P. gingivalis* e *P. nigrescens* da atividade de células dendríticas, bem como a indução de um fenótipo predominante de células Th17 mediado por TLR2 em APCs in vitro, o próximo passo foi examinar o efeito dos patógenos periodontais na progressão da artrite experimental in vivo, utilizando o modelo de CIA. Assim, camundongos imunizados com colágeno tipo II receberam a inoculação oral de *P. gingivalis* e *P. nigrescens*, resultando no aumento da severidade da lesão articular. Assim ambos os patógenos periodontais aumentaram os escores clínicos da artrite in vivo, mesmo na ausência de ACPAs que não foram detectados nas

condições experimentais utilizadas. Além disso, este aumento do escore macroscópico foi acompanhado por altos níveis sistêmicos de mediadores inflamatórios (IL-6 e KC mensurados no soro) induzido por *P. gingivalis* e *P. nigrescens*, enquanto a expressão local de genes inflamatórios no tecidos sinoviais artríticos foi induzida apenas por *P. gingivalis*, com um significativo aumento de catepsina K, um importante marcador da atividade osteoclástica, e de MMP-9, reconhecidamente um importante marcador de destruição articular, conforme demonstrado pelos altos níveis presentes no líquido sinovial de pacientes com AR ^{76, 83}. É importante comentar que a expressão de MMP-9 é principalmente induzida por leucócitos durante o processo inflamatório ¹⁷, e que IL-17 induz a produção de MMP-9 por leucócitos humanos ³². Dessa forma, é possível sugerir que, durante a artrite induzida por colágeno, a indução de MMP-9 pode ser mediada pela atividade de IL-17, conforme sugerido previamente na artrite induzida por antígeno, onde foi revelado o papel pro-nociceptivo de IL-17 neste modelo ⁶⁷. A partir desses resultados, decidimos investigar o efeito de *P. gingivalis* e *P. nigrescens* no fenótipo de células T desses animais, através da análise do perfil de citocinas de células T dos linfonodos drenantes articulares. Assim, demonstramos que ambos os periodontopatógenos induzem um fenótipo específico de células T produtoras de IL-17, enquanto promovem a redução de IL-4, esta induzida sobretudo por *P. nigrescens*. Assim, revelamos um potencial efeito de *P. gingivalis* e *P. nigrescens* na modulação da diferenciação de células T, o que resultou em um aumento da severidade da CIA, independentemente da citrulinização de peptídeos e indução de ACPAs. Isto porque o aumento de IL-17, assim como a supressão de IL-4 (sobretudo por *P. nigrescens*) foram suficientes para acelerar e aumentar a severidade da artrite, independentemente

da produção de ACPA. Provavelmente nas condições experimentais utilizadas não houve tempo suficiente para a produção de ACPAs, mesmo na presença de alguma citrulinização de peptídeos. Além disso, a baixa resposta de células B observada pode ser atribuída à não realização do reforço da imunização. Além disso, o fato de tanto *P. gingivalis* (expressão PAD) e *P. nigrescens* (não PAD) apresentarem um efeito sobre a erosão óssea reforça a hipótese de que a modulação do fenótipo de células T é um papel relevante dos patógenos periodontais na CIA. Dentro deste contexto, os nossos dados corroboram estudos anteriores onde foi observado o envolvimento de *P. gingivalis* e outros patógenos periodontais na alteração do perfil de células T ^{64, 77}. Outro dado importante que pudemos observar foi o efeito específico de *P. gingivalis* e *P. nigrescens* sobre a erosão óssea e que os altos níveis de IL-17 induzidos por *P. gingivalis* e *P. nigrescens* em camundongos CIA foram significativamente correlacionados com a intensidade da destruição do tecido ósseo. Em relação à erosão óssea, é conhecido que IL-17 pode induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias em osteoblastos incluindo IL-1, TNF- α , bem como de proteases (como MMP-9), e com o aumento da população de células Th17 induz, consequentemente, a destruição óssea ^{35, 41, 86}. Neste contexto, a importância de IL-17 em modelo de CIA foi demonstrada anteriormente, através do bloqueio de IL-17 com anticorpos neutralizantes, resultando na redução do infiltrado inflamatório, destruição da cartilagem e erosão óssea, mesmo nos estágios mais tardios após o início da doença ⁴⁸. Em suma, é possível afirmar que *P. gingivalis* e *P. nigrescens* podem contribuir para o aumento da erosão óssea na CIA experimental, primariamente através da indução do fenótipo Th17. Na artrite induzida por antígeno, também foi verificada a ação de *P.*

gingivalis na progressão desta doença, possivelmente mediada pela indução de Th17 e IL-17 enquanto a artrite experimental não modula a perda óssea alveolar induzida por *P. gingivalis*.

Em resumo, nossos dados evidenciam o papel patogênico da modulação da resposta imune por *P. gingivalis* e *P. nigrescens* na artrite independente da indução de ACPAs, tendo como principal atividade a modulação do perfil de células T e particular indução de Th17 sendo os níveis de IL-17 correlacionados com a intensidade de erosão óssea. Entretanto, podemos sugerir que esses periodontopatógenos atuam de maneira distinta sobre a progressão da CIA, com um efeito predominantemente local apresentado por *P. gingivalis* com a indução intra-articular de mediadores envolvidos na destruição tecidual, e uma ação de prevalência sistêmica de *P. nigrescens* através da indução do aumento de Th17 e concomitante redução de Th2, porém mais estudos são necessários para o melhor entendimento deste processo. Assim, este estudo reforça a teoria da participação causal dos periodontopatógenos na etiologia da artrite e sobretudo contribui para reafirmar a importância fundamental da promoção de um melhor controle da saúde periodontal em conjunto com a atenção médica aos pacientes com artrite reumatóide.

CONCLUSÃO

Conclusão

Em resumo:

- este estudo demonstrou a influência da infecção periodontal com diferentes periodontopatógenos sobre a gravidade da artrite em modelos experimentais distintos de mono- (artrite induzida por mBSA) ou poliartrite (artrite induzida por colágeno);
- de suma importância, este estudo revelou a modulação do fenótipo de células T, em especial a indução de Th17, como a característica relevante dos patógenos periodontais *P. gingivalis* e *P. nigrescens* na patogênese da artrite experimental, independentemente da atividade de PADs e produção de ACPA.
- esses dados sugerem uma relevância dos periodontopatógenos estudados na progressão da artrite, e especialmente a ação destes sobre erosão óssea na artrite induzida por colágeno;
- diferentes mecanismos e interfaces bactéria-hospedeiro são sugeridos para *P. gingivalis* e *P. nigrescens*, como um efeito predominantemente local de *P. gingivalis* no dano articular e um papel sistêmico de *P. nigrescens* na interferência funcional durante a artrite.

|

REFERÊNCIAS

Referências

- [1] Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LA, Koenders MI, Devesa I, Roelofs MF, Radstake TR, et al. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J Clin Invest* 2008;118:205-16.
- [2] Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem*. 2003;278:1910-4.
- [3] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:499-511.
- [4] Al-Katma MK, Bissada NF, Bordeaux JM, Sue J, Askari AD. Control of periodontal infection reduces the severity of active rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol*. 2007;13:134-7.
- [5] Andreaskos E, Sacre S, Foxwell BM, Feldmann M. The toll-like receptor-nuclear factor kappaB pathway in rheumatoid arthritis. *Front Biosci*. 2005;10:2478-88.
- [6] Barsante MM, Cunha TM, Allegretti M, Cattani F, Policani F, Bizzarri C, et al. Blockade of the chemokine receptor CXCR2 ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats. *Br J Pharmacol*. 2008;153:992-1002.
- [7] Bartold PM, Marino V, Cantley M, Haynes DR. Effect of *Porphyromonas gingivalis*-induced inflammation on the development of rheumatoid arthritis. *J Clin Periodontol*. 2010;37:405-11.
- [8] Bartold PM, Marshall RI, Haynes DR. Periodontitis and rheumatoid arthritis: a review. *J Periodontol*. 2005;76:2066-74.
- [9] Beck JD, Offenbacher S. Systemic effects of periodontitis: epidemiology of periodontal disease and cardiovascular disease. *J Clin Periodontol* 2005;76:2089-100.
- [10] Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol*. 2007;8:345-50.
- [11] Bush KA, Farmer KM, Walker JS, Kirkham BW. Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein. *Arthritis Rheum*. 2002;46:802-5.
- [12] Cantley MD, Haynes DR, Marino V, Bartold PM. Pre-existing periodontitis exacerbates experimental arthritis in a mouse model. *J Clin Periodontol*. 2011;38:532-41.
- [13] Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, et al. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*. 1999;42:963-70.
- [14] Corr M. The tolls of arthritis. *Arthritis Rheum*. 2005;52:2233-6.
- [15] Darveau RP, Pham TT, Lemley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect Immun*. 2004;72:5041-51.
- [16] de Pablo P, Chapple IL, Buckley CD, Dietrich T. Periodontitis in systemic rheumatic diseases. *Nat Rev*. 2009;5:218-24.
- [17] Di Girolamo N, Tedla N, Lloyd A, Wakefield D. Expression of matrix metalloproteinases by human plasma cells and B lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1998;28:1773-84.

* De acordo com o estilo Vancouver Disponível no site:
http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- [18] 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.
- [19] Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21:12-20.
- [20] Genco CA, Van Dyke T, Amar S. Animal models for *Porphyromonas gingivalis*-mediated periodontal disease. *Trends Microbiol.* 1998;6:444-9.
- [21] Golub LM, Payne JB, Reinhardt RA, Nieman G. Can systemic diseases co-induce (not just exacerbate) periodontitis? A hypothetical "two-hit" model. *J Dent Res.* 2006;85:102-5.
- [22] Gorska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2003;30:1046-52.
- [23] Greenwald RA, Kirkwood K. Adult periodontitis as a model for rheumatoid arthritis (with emphasis on treatment strategies). *J Rheumatol.* 1999;26:1650-3.
- [24] Gregersen PK, Behrens TW. Genetics of autoimmune diseases--disorders of immune homeostasis. *Nat Rev Genet.* 2006;7:917-28.
- [25] Hajishengallis G, Ratti P, Harokopakis E. Peptide mapping of bacterial fimbrial epitopes interacting with pattern recognition receptors. *J Biol Chem.* 2005;280:38902-13.
- [26] Havemose-Poulsen A, Westergaard J, Stoltze K, Skjodt H, Danneskiold-Samsøe B, Locht H, et al. Periodontal and hematological characteristics associated with aggressive periodontitis, juvenile idiopathic arthritis, and rheumatoid arthritis. *J Periodontol.* 2006;77:280-8.
- [27] Horai R, Nakajima A, Habiro K, Kotani M, Nakae S, Matsuki T, et al. TNF- α is crucial for the development of autoimmune arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Clin Invest.* 2004;114:1603-11.
- [28] Hourii-Haddad Y, Wilensky A, Shapira L. T-cell phenotype as a risk factor for periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2007;45:67-75.
- [29] Ishi Ede P, Bertolo MB, Rossa C, Jr., Kirkwood KL, Onofre MA. Periodontal condition in patients with rheumatoid arthritis. *Braz Oral Res.* 2008;22:72-7.
- [30] Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest.* 2006;116:1218-22.
- [31] Johnson RB, Wood N, Serio FG. Interleukin-11 and IL-17 and the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol.* 2004;75:37-43.
- [32] Jovanovic DV, Martel-Pelletier J, Di Battista JA, Mineau F, Jolicoeur FC, Benderdour M, et al. Stimulation of 92-kd gelatinase (matrix metalloproteinase 9) production by interleukin-17 in human monocyte/macrophages: a possible role in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43:1134-44.
- [33] Kaplan MJ. Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2006;18:289-97.
- [34] Kikkert R, Laine ML, Aarden LA, van Winkelhoff AJ. Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22:145-51.
- [35] Kleinschnitz C, Hofstetter HH, Meuth SG, Braeuninger S, Sommer C, Stoll G. T cell infiltration after chronic constriction injury of mouse sciatic nerve is associated with interleukin-17 expression. *Exp Neurol.* 2006;200:480-5.

- [36] Koenders MI, Devesa I, Marijnissen RJ, Abdollahi-Roodsaz S, Boots AM, Walgreen B, et al. Interleukin-1 drives pathogenic Th17 cells during spontaneous arthritis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Arthritis Rheum.* 2008;58:3461-70.
- [37] Koenders MI, Joosten LA, van den Berg WB. Potential new targets in arthritis therapy: interleukin (IL)-17 and its relation to tumour necrosis factor and IL-1 in experimental arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2006;65: 29-33.
- [38] Koenders MI, Kolls JK, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Joosten LA, Schurr JR, et al. Interleukin-17 receptor deficiency results in impaired synovial expression of interleukin-1 and matrix metalloproteinases 3, 9, and 13 and prevents cartilage destruction during chronic reactivated streptococcal cell wall-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005 ;52:3239-47.
- [39] Koenders MI, Lubberts E, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Helsen MM, Di Padova FE, et al. Blocking of interleukin-17 during reactivation of experimental arthritis prevents joint inflammation and bone erosion by decreasing RANKL and interleukin-1. *Am J Pathol.* 2005;167:141-9.
- [40] Koenders MI, Lubberts E, van de Loo FA, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Helsen MM, et al. Interleukin-17 acts independently of TNF-alpha under arthritic conditions. *J Immunol.* 2006;15;176:6262-9.
- [41] Koenders MI, Marijnissen RJ, Devesa I, Lubberts E, Joosten LA, Roth J, et al. Tumor necrosis factor-interleukin-17 interplay induces S100A8, interleukin-1beta, and matrix metalloproteinases, and drives irreversible cartilage destruction in murine arthritis: rationale for combination treatment during arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63:2329-39.
- [42] Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 2003;15:396-401.
- [43] Koshy PJ, Henderson N, Logan C, Life PF, Cawston TE, Rowan AD. Interleukin 17 induces cartilage collagen breakdown: novel synergistic effects in combination with proinflammatory cytokines. *Ann Rheum Dis.* 2002;61:704-13.
- [44] Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest.* 1999;103:1345-52.
- [45] Liao F, Li Z, Wang Y, Shi B, Gong Z, Cheng X. *Porphyromonas gingivalis* may play an important role in the pathogenesis of periodontitis-associated rheumatoid arthritis. *Med hypotheses.* 2009;72:732-5.
- [46] Lubberts E. IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis? *Cytokine.* 2008;41:84-91.
- [47] Lubberts E, Joosten LA, Oppers B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, et al. IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis. *J Immunol.* 2001;15;167:1004-13.
- [48] Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Joosten LA, et al. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum.* 2004;50:650-9.
- [49] Lubberts E, Koenders MI, van den Berg WB. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther.* 2005;7:29-37.
- [50] Lubberts E, van den Bersselaar L, Oppers-Walgreen B, Schwarzenberger P, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, et al. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis

through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. *J Immunol.* 2003;170:2655-62.

[51] Lundberg K, Wegner N, Yucel-Lindberg T, Venables PJ. Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection. *Nat Rev.* 2010;6:727-30.

[52] Lundy SK, Sarkar S, Tesmer LA, Fox DA. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis Res Ther.* 2007;9:202.

[53] Mahanonda R, Jitprasertwong P, Sa-Ard-Iam N, Rerkyen P, Charatkulangkun O, Jansisyanont P, et al. Effects of IL-17 on human gingival fibroblasts. *J Dent Res.* 2008;87:267-72.

[54] Mangat P, Wegner N, Venables PJ, Potempa J. Bacterial and human peptidylarginine deiminases: targets for inhibiting the autoimmune response in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther.* 2010;12:209.

[55] Martin M, Katz J, Vogel SN, Michalek SM. Differential induction of endotoxin tolerance by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. *J Immunol.* 2001;167:5278-85.

[56] Martin M, Schifferle RE, Cuesta N, Vogel SN, Katz J, Michalek SM. Role of the phosphatidylinositol 3 kinase-Akt pathway in the regulation of IL-10 and IL-12 by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *J Immunol.* 2003;171:717-25.

[57] Martinez-Martinez RE, Abud-Mendoza C, Patino-Marin N, Rizo-Rodriguez JC, Little JW, Loyola-Rodriguez JP. Detection of periodontal bacterial DNA in serum and synovial fluid in refractory rheumatoid arthritis patients. *J Clin Periodontol.* 2009;36:1004-10.

[58] McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2011;365:2205-19.

[59] Mercado F, Marshall RI, Klestov AC, Bartold PM. Is there a relationship between rheumatoid arthritis and periodontal disease? *J Clin Periodontol.* 2000;27:267-72.

[60] Mercado FB, Marshall RI, Klestov AC, Bartold PM. Relationship between rheumatoid arthritis and periodontitis. *J Periodontol.* 2001;72:779-87.

[61] Moen K, Bertelsen LT, Hellem S, Jonsson R, Brun JG. Salivary gland and temporomandibular joint involvement in rheumatoid arthritis: relation to disease activity. *Oral Dis.* 2005;11:27-34.

[62] Moen K, Brun JG, Valen M, Skartveit L, Eribe EK, Olsen I, et al. Synovial inflammation in active rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis facilitates trapping of a variety of oral bacterial DNAs. *Clin Exp Rheumatol.* 2006;24:656-63.

[63] Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang NP. Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomyetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. *J Periodontol.* 2000;71:14-21.

[64] Monteiro AC, Scovino A, Raposo S, Gaze VM, Cruz C, Svensjo E, et al. Kinin danger signals proteolytically released by gingipain induce Fimbriae-specific IFN-gamma- and IL-17-producing T cells in mice infected intramucosally with *Porphyromonas gingivalis*. *J Immunol.* 2009;183:3700-11.

[65] Nakae S, Saijo S, Horai R, Sudo K, Mori S, Iwakura Y. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:5986-90.

[66] O'Brien-Simpson NM, Pathirana RD, Paolini RA, Chen YY, Veith PD, Tam V, et al. An immune response directed to proteinase and adhesin functional epitopes protects against *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontal bone loss. *J Immunol.* 2005;175:3980-9.

- [67] Pinto LG, Cunha TM, Vieira SM, Lemos HP, Verri WA, Jr., Cunha FQ, et al. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain*. 2010;148:247-56.
- [68] Pischon N, Pischon T, Kroger J, Gulmez E, Kleber BM, Bernimoulin JP, et al. Association among rheumatoid arthritis, oral hygiene, and periodontitis. *J Periodontol*. 2008;79:979-86.
- [69] Ribeiro J, Leao A, Novaes AB. Periodontal infection as a possible severity factor for rheumatoid arthritis. *J Periodontol*. 2005;32:412-6.
- [70] Rosenstein ED, Greenwald RA, Kushner LJ, Weissmann G. Hypothesis: the humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis. *Inflammation*. 2004;28:311-8.
- [71] Sacre SM, Andreakos E, Kiriakidis S, Amjadi P, Lundberg A, Giddins G, et al. The Toll-like receptor adaptor proteins MyD88 and Mal/TIRAP contribute to the inflammatory and destructive processes in a human model of rheumatoid arthritis. *Am J Pathol*. 2007;170:518-25.
- [72] Sato K. Th17 cells and rheumatoid arthritis -from the standpoint of osteoclast differentiation. *Allergol Int*. 2008;57:109-14.
- [73] Shen F, Ruddy MJ, Plamondon P, Gaffen SL. Cytokines link osteoblasts and inflammation: microarray analysis of interleukin-17- and TNF-alpha-induced genes in bone cells. *J Leukoc Biol*. 2005;77:388-99.
- [74] Skapenko A, Leipe J, Lipsky PE, Schulze-Koops H. The role of the T cell in autoimmune inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2005;7 :S4-14.
- [75] Takahashi K, Azuma T, Motohira H, Kinane DF, Kitetsu S. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2005;32:369-74.
- [76] Tchetverikov I, Roday HK, Van El B, Kiers GH, Verzijl N, TeKoppele JM, et al. MMP profile in paired serum and synovial fluid samples of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2004;63:881-3.
- [77] Trombone AP, Claudino M, Colavite P, de Assis GF, Avila-Campos MJ, Silva JS, et al. Periodontitis and arthritis interaction in mice involves a shared hyper-inflammatory genotype and functional immunological interferences. *Gen Immun*. 2010;11:479-89.
- [78] Van Bezooijen RL, Papapoulos SE, Lowik CW. Effect of interleukin-17 on nitric oxide production and osteoclastic bone resorption: is there dependency on nuclear factor-kappaB and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK)/RANK ligand signaling? *Bone*. 2001;28:378-86.
- [79] Van Bezooijen RL, Van Der Wee-Pals L, Papapoulos SE, Lowik CW. Interleukin 17 synergises with tumour necrosis factor alpha to induce cartilage destruction in vitro. *Ann Rheum Dis*. 2002;61:870-6.
- [80] Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen KA, Lundberg K, et al. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and alpha-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010;62:2662-72.
- [81] Williams RC, Offenbacher S. Periodontal medicine: the emergence of a new branch of periodontology. *Periodontol* 2000. 2000;23:9-12.
- [82] Yago T, Nanke Y, Kawamoto M, Furuya T, Kobashigawa T, Kamatani N, et al. IL-23 induces human osteoclastogenesis via IL-17 in vitro, and anti-IL-23 antibody attenuates collagen-induced arthritis in rats. *Arthritis Res Ther*. 2007;9:R96.

- [83] Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2000 ;59:455-61.
- [84] Yoshimura A, Kaneko T, Kato Y, Golenbock DT, Hara Y. Lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* are antagonists for human toll-like receptor 4. *Infect Immun.* 2002;70:218-25.
- [85] Yu JJ, Ruddy MJ, Wong GC, Sfintescu C, Baker PJ, Smith JB, et al. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood.* 2007;109:3794-802.
- [86] Zhang F, Tanaka H, Kawato T, Kitami S, Nakai K, Motohashi M, et al. Interleukin-17A induces cathepsin K and MMP-9 expression in osteoclasts via celecoxib-blocked prostaglandin E2 in osteoblasts. *Biochim* 2011;93:296-305.
- [87] Zhou Q, Desta T, Fenton M, Graves DT, Amar S. Cytokine profiling of macrophages exposed to *Porphyromonas gingivalis*, its lipopolysaccharide, or its FimA protein. *Infect Immun.* 2005;73:935-43.
- [88] Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, Ksiezopolska-Pietrzak K, Klimczak E, Chwalinska-Sadowska H, et al. High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol.* 2000 ;164:2832-8.

|

ANEXOS



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEEA nº 21/2008

Araraquara, 07 de outubro de 2008

Senhores Pesquisadores:

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA desta Faculdade reunido em 06/10/2008, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Associação entre artrite reumatóide e doença periodontal: avaliação do eixo IL23/IL17" (Proc. CEEA nº 21/2008) **AUTORIZA** a realização da pesquisa, ficando a aprovação vinculada à apresentação do **RELATÓRIO FINAL (NOVEMBRO/2012)**

Atenciosamente,

Profa. Dra. ELENY BALDUCCI ROSLINDO
Coordenadora do CEEA

Ao

Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Pesquisador Responsável

a/c Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha e Sabrina Garcia de Aquino

Nesta

ANEXO 2

April 2, 2012

Title: "Periodontal Pathogens Directly Promote Autoimmune Arthritis by Inducing a Toll-like Receptor 2 and Interleukin-1 Driven Th17 Response"

Tracking #: 2012-05416

Author(s):

Sabrina Garcia de Aquino (Radboud University Nijmegen Medical Centre, The Netherlands and Araraquara Dental School, Brazil)

Shahla Abdollahi-Roodsaz (Radboud University Nijmegen Medical Centre)

Marije I Koenders (Radboud University Nijmegen Medical Center)

Fons A. J. van de Loo (Radboud University Nijmegen Medical Centre)

Ger Pruijn (Radboud University Nijmegen)

Renoud Marijnissen (Radboud University Nijmegen Medical Centre)

Birgitte Walgreen (Radboud University Nijmegen Medical Centre)

Monique M.A. Helsen (University Medical Center Nijmegen)

Lidwine van den Bersselaar (Radboud University Nijmegen Medical Centre)

Mario Julio Avila Campos (Institute of Biomedical Sciences-ICB/USP, Sao Paulo)

Fernando Q. Cunha (University of Sao Paulo - Faculty of Medicine of Ribeirao Preto)

Joni Augusto Cirelli (Araraquara Dental School, Sao Paulo)

Wim B. van den Berg (Radboud University Nijmegen Medical Centre)

Dear Dr. de Aquino,

"Periodontal Pathogens Directly Promote Autoimmune Arthritis by Inducing a Toll-like Receptor 2 and Interleukin-1 Driven Th17 Response," for which you participated as an author, was submitted by Ms. Abdollahi-Roodsaz and received in our office on April 02, 2012. The manuscript has been assigned tracking number 2012-05416.

You may check on the status of your manuscript at any time by clicking the link below and selecting the "Check Status" link. Please also check your name and institutional affiliation in the list at the beginning of this email. If the manuscript is accepted for publication, **this is how your name and institutional affiliation will appear on the published article**. To make any corrections to your contact and affiliation information, please click Manuscript Home to get to your desktop and then click the Modify Profile link to get to your profile page. We encourage you to make these corrections as soon as possible to prevent any possible publication errors. If you have any questions or need help, please contact our office.

[Please view the manuscript](#)

PNAS License to Publish is collected for most manuscripts at initial submission. The summary below reflects our records of the PNAS License to Publish type selected by the submitting author at that time. Please contact us immediately at PNASAuthorLicense@nas.edu or 202-334-2679 if this information is incorrect or you have any questions. In the event that your manuscript is

withdrawn or not accepted for publication in PNAS, the PNAS License to Publish will be terminated and all rights revert to the author(s).

PNAS License to Publish Summary: PNAS License to Publish conveyed to the National Academy of Sciences. PNAS and all authors agree that this agreement will be executed electronically.

PNAS License to Publish Complete: Yes

Date PNAS License to Publish Completed: 2012-03-30

Thank you for submitting to PNAS.

Sincerely yours,

PNAS Editorial Office

(p) 202.334.2679

(f) 202.334.2739

(e) pnas@nas.edu

ANEXO 3: MATERIAL E MÉTODO

MÉTODOS: CAPÍTULO – 1

Obtenção e manutenção de animais

Os experimentos foram realizados em camundongos C57/Bl6 selvagens (WT) machos e adultos (18-22g), mantidos no biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP-USP), Departamento de Farmacologia. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas limpas, em temperatura controlada (22-25°C), com ciclos de claro e escuro (12:12h) e receberam alimentação e água *ad libitum*. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (Anexo 1) e realizado de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Delineamento Experimental

Os animais foram divididos em 4 grupos nos seguintes grupos experimentais (n=5):

1-Controle (C): sem doença ou sham-tratados

2-Grupo artrite (AR): indução de artrite induzida por antígeno (AIA) com soro albumina bovina metilada (mBSA)

3-Grupo doença periodontal (DP): indução de doença periodontal experimental com inoculação oral de *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)

4-Grupo artrite + doença periodontal (ARDP): indução de AIA seguindo-se a inoculação de *P. gingivalis* iniciada 1 dia antes da última imunização. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical aos 7, 15, 30 e 45 dias conforme demonstrado a seguir:

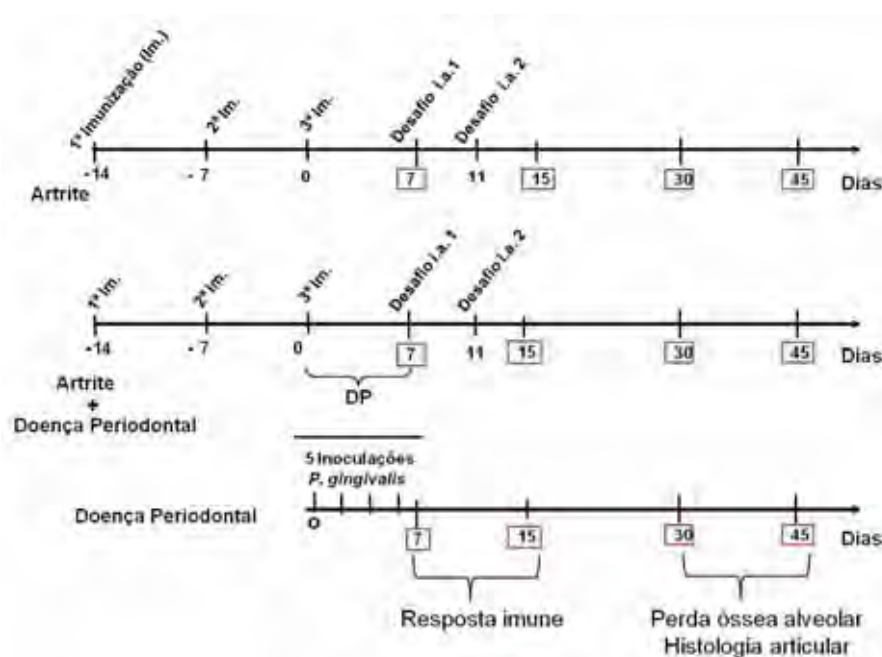


Figura 1- Delineamento experimental

Indução da artrite experimental

A indução da artrite experimental induzida por antígeno (mBSA) foi realizada nos camundongos C57/Bl6 pesando entre 18-22g. Os animais foram sensibilizados com 3 aplicações com intervalo semanal (Fig. 1 - dias: -14, -7 e 0) de 500µg de mBSA (Sigma, St. Louis, MO) diluídos em 0.2 mL de uma emulsão contendo 0.1mL de solução salina e 0.1 mL de solução adjuvante de Freund completa (Sigma) administrado por injeção subcutânea. Os animais do grupo Controle receberam injeções similares, porém sem a adição de mBSA. Após 7 dias da última injeção (Fig. 1- dia 7) a artrite foi induzida nos animais imunizados por meio de injeção intra-articular de mBSA-desafio: -10µg para mensuração de hipernocicepção mecânica e do nível de citocinas articular ou 30µg/cavidade para análise de lesão (histologia articular) diluído em 10µL de solução salina. Para a avaliação de lesão articular foi necessária a repetição da injeção intra-articular na dose de 30µg (redesafio) após 4 dias (Fig.1 – dia11).

Processamento histopatológico

Logo após o sacrifício dos animais, no período de 30 dias, as articulações fêmur tibiais foram removidas e fixadas em paraformaldeído a 4% (pH 7.4) por 48 horas e em seguida descalcificadas com trocas sucessivas de EDTA a 10% (pH 7.4). Após a descalcificação, as peças foram lavadas em água corrente *overnight* e em seguida desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes seriados de 6µM, montados em lâminas apropriadas e destinados às análises descritas a seguir:

-Coloração de H&E

Cortes de 6µM obtidos das patas dos animais (articulação fêmur-tibiais) receberam a coloração de H/E e foram examinados quanto ao grau de inflamação sinovial e de destruição óssea através da avaliação dos seguintes parâmetros: edema, inflamação sinovial, acúmulo de neutrófilos e erosão de cartilagem e óssea. Para isto, foram atribuídos de forma cega escores de 0 a 3 de acordo com a intensidade do processo inflamatório e erosivo (ausente/leve/moderado/severo) conforme descrito previamente^{2,6}. Assim, o escore utilizado para análise da severidade do dano articular foi o seguinte: 0: ausência de sinais de artrite; 1: Leve: pouca sinovite e perda da cartilagem e erosão óssea limitada para um discreto local; 2; Moderada: sinovite e erosão presente e com arquitetura da articulação intacta; 3: Grave: sinovite, erosão extensa e arquitetura da articulação não intacta. Foram analisados 3 cortes por articulação de cada animal dos diferentes grupos experimentais.

-Degradação de Proteoglicanos na cavidade articular –Coloração de Safranina

Sendo o proteoglicano um abundante constituinte da cartilagem articular, a avaliação da degradação deste componente pode ser considerada um importante parâmetro de avaliação de destruição/lesão tecidual. Dessa forma, julgamos importante comparar a degradação de proteoglicano em amostras dos diferentes grupos experimentais através da coloração de Safranina. Cortes seriados de 6 µm de espessura foram obtidos e submetidos à coloração para proteoglicanos (Safranina). O grau de degradação articular foi avaliado de forma cega por um examinador comparando-se os níveis de proteoglicanos (intensidade de marcação) nos diferentes

grupos experimentais. Após captura de imagem das articulações (câmera digital Leica DFC 300 FX magnificação de 100X), o escore de depleção de proteoglicano foi determinado conforme descrito por Dutler et al, 2000 ², e van Holter et al 2004 ⁶. Resumidamente, foi empregado o seguinte escore: 0: sem depleção de proteoglicano; 1: pouca depleção de proteoglicano; 2: moderada depleção de proteoglicano; 3: perda completa de proteoglicano. Foram analisados 3 cortes por articulação de cada animal dos diferentes grupos experimentais.

Indução da doença periodontal

Para a indução da doença periodontal foram realizadas, com auxílio de uma micropipeta, 5 inoculações de aproximadamente 10^8 UFC de *P. gingivalis* (ATCC33277) num volume de 75 uL de PBS com carboximetilcelulose a 2%, com intervalo de 48 horas entre as mesmas e iniciadas 1 dia antes da 3ª imunização. Considerando que nos primeiros 7 dias após início das inoculações deve ocorrer a colonização/instalação bacteriana, optamos por iniciar as inoculações de *P. gingivalis* nesta data e não juntamente ou logo após o desafio articular para que o início das 2 doenças fossem coincidentes (vide delineamento experimental).

Quantificação da reabsorção óssea alveolar

Hemimaxilas de animais sacrificados 30 e 45 dias após início da indução da doença periodontal (baseline) foram empregadas na quantificação do processo de reabsorção óssea alveolar através de coloração com azul de metileno. Dessa forma, 5 peças de cada um dos grupos experimentais (controle, artrite, doença periodontal e artrite + doença periodontal) dos diferentes períodos (30 e 45 dias) foram mantidas em solução de peróxido de hidrogênio por 24 horas e limpas para remoção do tecido mole remanescente. As peças foram então armazenadas em álcool 70% até o momento de serem coradas com azul de metileno. Este foi preparado com a adição de 0,7g do corante dissolvidos em 50 ml de etanol a 95% com posterior diluição de 2,5 ml dessa solução em 47,5 ml de água e manutenção das peças no corante durante 5 minutos. Em seguida, a face lingual das peças foi fotografada em estereomicroscópio (*Leica MZ6* - magnificação de 40X) e as mesmas analisadas por examinador treinado e cego com uso do programa Image J 1.34 (NIH Image). Assim, a região compreendida entre o

início da raiz mesial do primeiro molar e o final da raiz distal do segundo molar foi considerada para a mensuração da área de perda óssea compreendida entre a junção cimento esmalte (JCE) e o osso alveolar.

Avaliação Nociceptiva

Com relação a parâmetros inflamatórios articulares, julgamos importante avaliar nos animais do período de 7 dias de indução da doença periodontal um importante parâmetro inflamatório utilizado no estudo da artrite experimental em camundongos: a dor. Assim, investigamos se o limiar hipernociceptivo (dor) dos animais submetidos à indução concomitante da artrite e doença periodontal experimental também é alterado, a partir da medida de hipernocicepção mecânica na pata de camundongos através do Teste de pressão crescente na pata (von Frey Eletrônico) conforme previamente descrito por Pinto et al, 2010⁵ para o teste de hipernocicepção mecânica na articulação fêmur-tibial. Basicamente esse método é realizado por meio de um anestesímetro eletrônico (Modelo 1601C, IITC Life Science Instruments, CA, USA), composto por um transdutor de pressão ligado por um cabo a um detector digital de força, que é então expressa em gramas. Uma pressão gradualmente crescente com uma ponteira de polipropileno é aplicada na região central da pata traseira do animal de modo a provocar o reflexo de retirada da pata (flexão da articulação fêmur-tibial) e a força necessária para provocar esse reflexo é então registrada. Os animais foram posicionados em caixas acrílicas com assoalho formado por uma rede de malhas medindo cerca de 5 mm² de arame não maleável de 1 mm de diâmetro permitindo dessa forma a estimulação mecânica da pata traseira dos animais. Antes do início dos experimentos os animais permaneceram nessas caixas por quinze minutos para a adaptação. Foram realizadas três medidas distintas para cada animal, sendo calculada a média aritmética das medidas. O limiar mecânico foi registrado 10 horas após a injeção intra-articular (desafio) com mBSA (10µg).

Nível articular de citocinas - técnica de ELISA

A quantificação de IL-17, TNF- α e IL-1 β , assim como a titulação de IgG anti-mBSA, foi realizada de acordo com Pinto et al, 2010⁵ por meio da técnica de ELISA

(*enzyme-linked immunosorbent assay*). Para isto, os camundongos do período de 7 dias foram sacrificados 10 horas após o desafio intra-articular, mais especificamente, imediatamente após o teste de hipernocicepção mecânica acima descrito). Assim, a articulação fêmur-tibial foi coletada em 300 μ L de PBS/EDTA (1 mM) e triturada com o auxílio de polytron com posterior centrifugação (10 minutos a 600 g). O sobrenadante foi então coletado para a dosagem dos níveis de citocinas por ELISA. Para isto, placas de microtitulação (96 poços) foram preenchidas inicialmente (50 μ L / poço) com os anticorpos específicos (anti-TNF- α , anti-IL-17 e anti IL-1 β - R&D Systems) diluídos em solução-tampão de ligação (pH 9.0), e incubados de 18 a 24 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBS/Tween-20 (0.05%; Sigma) e incubadas com 100 μ L de solução de albumina bovina a 1% por 2 horas à temperatura ambiente (bloqueio de ligações inespecíficas). Em seguida, 50 μ L das amostras e a da curva-padrão foram adicionadas às placas e incubadas por 18-24 horas a 4°C com posterior lavagem e incubação com anticorpos policlonais biotinilados específicos por 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram então novamente lavadas e, incubadas com avidina conjugada à HRP (1:5000), por 30 minutos. Uma última lavagem das placas foi realizada e 50 μ L do substrato dihidroclorato de 1,2-fenilenodiamina foi adicionado. Após 15 minutos, a reação foi interrompida com 50 μ L de H₂SO₄ (1 M) e a densidade óptica (DO) medida a 490 nm em espectrofotômetro (Spectra Max-250, Molecular Devices). Os resultados foram expressos em pg/mL.

Análise de citometria de fluxo de células T

Imediatamente após o sacrifício dos animais correspondentes ao período de 15 dias, os linfonodos cervicais, assim como os inguinais e poplíteos foram coletados e mantidos em meio de cultura RPMI para serem em seguida processados para o isolamento das células totais com a utilização de uma peneira com malha de nylon estéril (cell strainer - BD Biosciences). Para isto, os linfonodos foram então macerados em meio RPMI com o êmbolo de uma seringa plástica estéril de 1 mL sobre a peneira e a suspensão celular foi então recolhida em tubo falcon de 15 mL. Após centrifugação (350g durante 10 min.) foi feita lavagem com meio RPMI incompleto, aspiração do sobrenadante e ressuspensão em menor volume de meio RPMI completo para

contagem e ajuste do total de células para identificação de células Th17 e Treg por citometria de fluxo de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences-Pharmingen). Assim, foi realizado previamente o estímulo de 2×10^6 cels. em 1mL de meio de cultura RPMI completo contendo PMA 50ng/mL e ionomicina (500ng/mL) durante 4 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período as células isoladas dos linfonodos cervicais e inguinais foram lavadas com tampão de FACs (PBS + 1% de soro albumina bovina) e coradas utilizando-se anticorpo anti-CD4-FITC diluído em tampão de FACs (1:100 em tampão de FACs). Após incubação por 20 min., as células foram então lavadas com tampão de FACs e posteriormente incubadas por 20 min. com tampão de permeabilização. Em seguida, as células foram coradas com anticorpos anti-IL17-PE (1:100 em tampão de permeabilização) por 30 min. e fixadas em PBS contendo 2% de paraformaldeído. A marcação de Fox-P3 foi realizada de forma semelhante de acordo com instruções do do kit (BD Biosciences-Pharmingen). Entretanto, previamente à permeabilização celular, foi realizada a etapa adicional de fixação das células (Tampão de fixação – 30 min). A diluição empregada foi de 1:100 em tampão de permeabilização. Apropriados isotipos controle foram usados nas análises de citometria. Todos os anticorpos foram provenientes da BD Biosciences-Pharmingen. Análise das células foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCantoll utilizando-se o software FACs Diva).

Análise estatística

Os dados foram representados como médias +/- SEM e são representativos de 2 experimentos separados. As médias dos diferentes grupos foram comparadas por ANOVA e correção de Tukey. Significância estatística foi determinada com $p < 0.05$. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o programa GraphPad 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

MÉTODOS: CAPÍTULO-2 Animais.

Camundongos DBA-1 machos foram obtidos de Janvier, França. Camundongos IL-1Ra^{-/-} em background BALB/c foram gentilmente cedidos pelo Dr. M. Nicklin (Sheffield, UK). Camundongos IL-1 Ra^{-/-} (TLR2^{+/+}) e TLR2^{-/-} (IL-1Ra^{-/-}) foram gerados,

conforme descrito anteriormente ⁴. Os animais foram alojados em gaiolas com filtro e receberam água e comida *ad libitum*. Animais pareados em idade e sexo foram usados em todos os experimentos. Os estudos com animais foram aprovados pelo Conselho de Ética Institucional e realizados de acordo com os códigos de prática em experimentação animal.

Indução da artrite induzida por colágeno (CIA).

Artrite foi induzida em camundongos DBA-1 entre 10 e 12 semanas de idade. Colágeno Bovino tipo II foi dissolvido em 0,05 M de ácido acético a uma concentração de 0,5 mg/mL e emulsionado em igual volume de adjuvante completo de Freund 0,5 mg/ mL de *M. Tuberculosis* (cepaH37Ra; Difco laboratórios, EUA). Os camundongos foram imunizados no dia 0 (baseline), por injeção intradérmica de 100 µL da emulsão na base da cauda.

Avaliação da artrite.

A severidade da artrite foi avaliada macroscopicamente por dois observadores cegos e pontuada em uma escala entre 0 e 2 para cada pata, conforme descrito anteriormente ³. Para análise histológica, as articulações do tornozelo foram isoladas no dia do sacrifício (dia 30) e fixadas durante quatro dias em formaldeído a 4%, em seguida descalcificadas em 5% de ácido fórmico e embebidos em parafina. Cortes de tecido de 7 µm foram corados com Hematoxilina & Eosina para determinar o infiltrado de células inflamatórias e morte de condrócitos ou com a coloração safranina O para determinar a destruição da cartilagem, bem como a destruição óssea. Cada parâmetro foi pontuado em uma escala 0-3 por dois observadores independentes, de forma cega. De forma resumida, as alterações histopatológicas foram quantificadas baseadas nos seguintes parâmetros: A infiltração de células recebeu escores de 0 a 3 dependendo da quantidade de células inflamatórias na cavidade articular e tecido sinovial (ausência/ moderada/ elevado infiltrado celular). A perda de proteoglicados quantificada também numa escala de 0 a 3, da coloração total da cartilagem (ausência de degradação de proteoglicano- escore 0), redução da intensidade da coloração (escore 2) até a

completa perda da cartilagem articular (escore 3.) As alterações histológicas foram quantificadas em 5 cortes semi-seriados da articulação tíbio tarsal.

Indução da periodontite experimental.

Periodontite experimental foi induzida pela inoculação oral com micropipeta de 1×10^8 UFC de *P. gingivalis* ATCC 33277 ou *Prevotella nigrescens* (*P. nigrescens*) 33563 (cultivadas em condições anaeróbicas em ágar sangue suplementado), diluída em 75 μ L de tampão fosfato contendo 2% de carboximetilcelulose nos dias 14, 16, 18, 20 e 22 após a imunização com colágeno tipo II. O grupo controle incluiu camundongos não infectados que receberam 5 inoculações da solução de CMC a 2%

Geração e maturação de células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs).

Células da medula óssea foram isoladas de camundongos Balb/c e IL-1 Ra^{-/-} de 5 a 6 semanas de idade (sem artrite) e cultivadas por 9 dias na presença de 20ng/mL de GM-CSF (R&D). O fenótipo das células dendríticas (DCs) foi controlado através da análise da expressão de CD11c por FACS utilizando anticorpos anti-CD11c-APC na diluição de 1:15 em tampão de FACS (BD-PharmMingen). Para a maturação das DCs e produção de citocinas, 1×10^5 DCs imaturas foram semeadas e incubadas com 100ng/mL de LPS de *E. coli* purificado, *P. gingivalis* ou *P. nigrescens* inativadas pelo calor (10^7 CFU/poço) por 20 horas. A maturação foi determinada após este período pelo aumento da expressão de marcadores MHC II, CD86 e CD40 por citometria de fluxo (FACS). Assim, as células dendríticas foram coradas incubando-se as células durante 30 minutos com anticorpos: anti-MHCII-FITC (1:50), (BiomedicalsBMA), anti-CD86-PE (1:100) e anti-CD40 (1:200) (BD-PharMingen) diluídos em tampão de FACS (PBS + 1% de soro albumina bovina) e então lavadas com tampão de FACS e fixadas em PBS contendo 2% de paraformaldeído. Apropriados isotipos controle foram usados em todas as análises de citometria. Análise das células foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur utilizando-se o software CellQuest (BD Biosciences-Pharmingen).

Isolamento, cultura e estímulo de linfócitos

Cultura de linfonodos. Após o sacrifício, linfonodos poplíteos e inguinais de camundongos com CIA que receberam as inoculações orais de *P. gingivalis*, *P. nigrescens* ou CMC foram coletados e armazenados em meio de cultura RPMI para serem em seguida processados para o isolamento das células totais com a utilização de uma peneira com malha de nylon estéril (cell strainer - BD Biosciences). Para isto, os linfonodos foram então macerados em meio RPMI com o êmbolo de uma seringa plástica estéril de 1 mL sobre a peneira e a suspensão celular foi então recolhida em tubo falcon de 15 mL. Após centrifugação (5 min. 1500 RPM) foi feita lavagem com meio RPMI, aspiração do sobrenadante e ressuspensão em menor volume de meio RPMI completo para contagem e ajuste do total de células. 2×10^5 cels./poço foram cultivadas em placas de 96 wells em RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 1mM de piruvato e 50 mg/L de Gentamicina a 37° C, 5% CO₂ na presença de anti-CD28 (2 µg/ml, BD Biosciences) com prévio *coating* da placa com anti-CD3 (1 µg/ml R&D) ou com colágeno bovino tipo II (50 µg/ml) durante 96 horas.

Co-cultura de células apresentadoras de antígeno (APCs) e células T

Imediatamente após o sacrifício, baços de camundongos Balb/c naíve e IL-1Ra^{-/-} (TLR2^{+/+}) e TLR2^{-/-} (IL-1Ra^{-/-} sem artrite) foram coletados e armazenados em meio de cultura RPMI para serem em seguida processados para o isolamento das células totais com a utilização de uma peneira com malha de nylon estéril (cell strainer - BD Biosciences). Para isto, o baço foi então macerado em meio RPMI com o êmbolo de uma seringa plástica estéril de 1 mL sobre a peneira e a suspensão celular foi então recolhida em tubo falcon de 15 mL. Após centrifugação (5 min. 1500 RPM) foi feita a adição de tampão de lise (4 mL durante 3 minutos em temperatura ambiente). A reação de lise foi paralisada pela adição de 1mL de soro fetal bovino (SFB) e imediata homogeneização, seguida da adição de 40mL de solução salina estéril 2 novas etapas de lavagem, centrifugação e posterior contagem e ajuste do total de células destinadas à separação celular magnética de acordo com as instruções do fabricante do kit (MACS - Miltenyi Biotec). Em seguida, as células T efetoras CD4⁺ CD25⁻ (T ef., 50,000 cels./poço) foram cultivadas juntamente com células CD4⁻ consideradas APCs

(previamente irradiadas -30 Gy- 150,000 cels./poço) em placas que receberam o pré-coating de anti-CD3(1µg/ml, R&D). As células foram cultivadas na presença de TGF-β (10 ng/mL) e dos seguintes estímulos: PMA (50 ng/mL, Sigma), ionomicina (1µg/mL, Sigma), inibidor do tráfego de Golgi Brefeldina (1 µL/mL, BD Biosciences), Pam3Cys (1µg/mL, EMC Microcollections), *P. gingivalis* ou *P.nigrescens* inativadas pelo calor (10⁷ UFC/poço). O tempo de incubação foi de 72 horas para anti-CD3, 4 horas para PMA/ionomicina/Brefeldin.

Análise de citometria de fluxo das células T

Células Th17 e Th1 da co-cultura de células T e APCs foram coradas com anticorpo anti-CD4-APC (1:300 em tampão de FACs) durante 30 minutos e em seguida lavadas com tampão de FACs. Após incubação com tampão de fixação/permeabilização (e-Bioscience) as células foram novamente lavadas e em seguida, coradas por 30 minutos com anti-IL17-PE (1:400) e anti-IFNγ-FITC (1:400) diluídos em tampão de permeabilização-e-Bioscience) e então lavadas com tampão de FACS e fixadas em PBS contendo 2% de paraformaldeído. Isotipos controle apropriados foram usados em todas as análises de citometria. Todos os anticorpos foram provenientes da BD Biosciences-Pharmingen. Análise das células foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur utilizando-se o software CellQuest (BD Biosciences-Pharmingen).

Mensuração dos níveis de citocinas.

Concentração de citocinas no sobrenadante de cultura (de BMDCs, de linfonodos e de co-cultura de células APC-T do baço), bem como do soro dos camundongos foram determinadas utilizando-se os ensaios de citocinas Bioplex da Bio-Rad, EUA segundo as instruções do fabricante.

Isolamento de RNA de biópsias sinoviais.

Biópsias da sinóvia das articulações do joelho foram isoladas a partir da porção lateral e medial da patela utilizando-se um coletor de biópsia de 3 milímetros (Stiefel,

Wächtersbach, Alemanha) no dia 30. Quatro biópsias de cada camundongo (duas de cada articulação) foram agrupadas para garantir rendimento suficiente de RNA. O RNA total foi isolado em reagente Trizol (Sigma, St. Louis, MO), então precipitado com isopropanol, lavado com etanol 70% e dissolvido em água. O RNA foi tratado com Dnase e posteriormente transcrito em DNA complementar utilizando oligo (dT), primers e transcriptase reversa MMLV.

Reação de polimerase em cadeia em tempo real- Real time PCR

PCR quantitativo em tempo real foi realizado utilizando o ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) para a quantificação com SYBR Green e análise da curva de melting. O isolamento de RNA, a análise do PCR em tempo real (qPCR) e as sequências dos primers, exceto de MMP-9, foram previamente descritas ¹. A sequência do primer para MMP9 utilizada foi a seguinte: 5'-GGA-ACT-CAC-ACG-ACA-TCT-TCC-A-3' (forward) and 5'-GAA-ACT-CAC-ACG-CCA-GAA-GAA-TTT-3' (reverso). As Condições do PCR foram as seguintes: 2 minutos a 50°C e 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos cada um a 95°C e 1 minuto a 60°C, com coleta de dados durante os últimos 30 segundos. Para todos os PCRs, SYBR Green Master Mix foi utilizado na reação. As concentrações de primers foram 300 nM. O valor de Ct do gene de interesse foi corrigido para o Ct do gene referência GAPDH para obter o ΔCt . Expressão do mRNA relativo foi calculado por $2^{-\Delta Ct}$. Análise de PCR quantitativo para cada amostra foi realizada em duplicata e as curvas de melting foram corridas para cada PCR.

Detecção de anticorpos anti-peptídeos citrulinados (ACPAs)- ELISA

Anticorpos contra o peptídeo CCP2 e peptídeos citrulinados derivados de vimetina (GVYATCitSSAVCitLCitSSVPG), fibrinogênio (QMRMELECitPGGNEITCitGGSTSYG) e α -enolase (LKIHACitEIFDSCitGNPTV) foram determinados por ELISA. Todos os peptídeos foram sintetizados com um spacer (espaçador interno transcrito) C-terminal e "tag" de biotina. Placas pré revestidas com streptavidina e pré- bloqueadas (StreptaWell, Roche-Applied-Science) receberam 10µg/mL do peptídeo diluído em PBS/0.1% BSA overnight at 4 °C. As placas foram então incubadas com 100 µl/well de

soro (100 x diluída em PBS/1% BSA/0.05% Tween-20) por 1 h a 37 °C. Após lavagem com PBS/0.05% Tween-20, os anticorpos ligados foram detectados por incubação por 1 h com 100 µl/well de anticorpo rabbit-anti-mouse conjugado à HRP (P0260, DAKO, Glostrup, Denmark) (1:1000 em PBS/1% BSA/0.05% Tween-20), seguido pela visualização com 100 µl/well de solução de 3,3',5,5'-tetramethylbenzidina (TMB) 1:1 com peróxido de uréia como substrato, seguido por 100 µl/well 2 M H₂SO₄ durante 10 minutos por último para parar a reação de coloração. Valores de densidade óptica (OD) foram mensurados em leitor de ELISA a 450nm.

Análise estatística. As medidas de cada grupo estão expressas como média ± S.E.M. Estatística foi avaliada usando o teste de Mann Whithney U para comparar 2 grupos experimentais ou teste de Kruskal-Wallis para comparar mais de 2 grupos. Análise foi realizada utilizando bicaudal t de Student software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad software Inc., EUA). Valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos.

Referências:

- [1] Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LA, Koenders MI, Devesa I, Roelofs MF, Radstake TR, et al. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J Clin Invest*. 2008;118:205-16.
- [2] Dudler J, Renggli-Zulliger N, Busso N, Lotz M, So A. Effect of interleukin 17 on proteoglycan degradation in murine knee joints. *Ann Rheum Dis*. 2000;59:529-32.
- [3] Joosten LA, Helsen MM, van de Loo FA, van den Berg WB. Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra. *Arthritis Rheum*. 1996;39:797-809.
- [4] Nakae S, Saijo S, Horai R, Sudo K, Mori S, Iwakura Y. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:5986-90.
- [5] Pinto LG, Cunha TM, Vieira SM, Lemos HP, Verri WA, Jr., Cunha FQ, et al. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain*. 148:247-56.
- [6] van Holten J, Reedquist K, Sattone-Roche P, Smeets TJ, Plater-Zyberk C, Vervordeldonk MJ, et al. Treatment with recombinant interferon-beta reduces inflammation and slows cartilage destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res ther*. 2004;6:R239-49.

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

Araraquara, 02 de abril de 2012.

SABRINA GARCIA DE AQUINO