UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia)

Dinâmica da Resposta do Hospedeiro na Periodontite Induzida por Ligadura

GUSTAVO HENRIQUE APOLINÁRIO VIEIRA

RIBEIRÃO PRETO

2016

GUSTAVO HENRIQUE APOLINÁRIO VIEIRA

**Dinâmica da Resposta do Hospedeiro na
Periodontite Induzida por Ligadura**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Doutor em Periodontia.

Versão Corrigida

Orientador: Prof. Dr. Mário Taba Júnior

RIBEIRÃO PRETO

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto.

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Vieira. Gustavo Henrique Apolinário

Dinâmica da resposta do hospedeiro na periodontite induzida por ligadura. /Gustavo Henrique Apolinário Vieira; orientador Mário Taba Júnior- Ribeirão Preto, 2016. Versão corrigida da Dissertação/Tese. A versão original se encontra disponível na Forp-USP

109 f.: il.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2016. Área de concentração: Periodontia.

1. Periodontite, 2. Resposta Inflamatória, 3. Genes.

VIEIRA, G. H. A. **Dinâmica da resposta do hospedeiro na periodontite induzida por ligadura.** Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Odontologia (Periodontia).

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Mas, pela graça de Deus, sou o que sou,
E a graça que ele me deu não tem sido inútil.
Ao contrário, tenho trabalhado mais do que todos eles;
Não eu, mas a graça de Deus que está comigo
I Co 15:10

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades.

Aos meus pais, por sempre me incentivarem e mostrem a importância da educação como meio de crescimento.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mário Taba Júnior por todo incentivo e colaboração na formação do pensamento crítico que contribuiu de forma definitiva para minhas escolhas futuras.

Ao professor Dr. Dana Graves por ter me possibilitado o estágio na Universidade da Pennsylvania e ao Marcelo Matos pelas contribuições profissionais e pessoais que ajudaram a elevar meus padrões na pesquisa.

Aos professores do programa de pós-graduação em Periodontia da FORP – USP: Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior, pela oportunidade de participar do programa e pelos conhecimentos transmitidos; prof. Dr. Sérgio Scombatti, pelos ensinamentos e pelo exemplo de dedicação e responsabilidade; Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto, pela sua atenção, dedicação e incentivo; Prof. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi pelos ensinamentos, por nos transmitir sua paixão pela odontologia e sempre nos estimular em busca do conhecimento. E em especial Ao prof. Dr. Michel Reis Messor, que desde o início sempre esteve disposto a contribuir com o meu crescimento.

A Adriana Silveira e Souza e a Viviane Mariguela pela colaboração indispensável para a materialização deste trabalho.

Aos amigos de turma: Paula Pessoa, André Moreira, Cristine Borges, Mariana Sales, Felipe Santos, Tulio Pignaton, Kelly Roccio, Umberto Ramos, Carolina Delmondes, Carolina Mandeta, Patricia Garani, Danilo Reino, Luciana Maia, Felipe Torres, Sérgio Lago, Milena Irie, Carla Silva, Camila Costa e Marcos Invernici por todo companheirismo, cumplicidade e carinho compartilhados durante toda essa jornada. Obrigada por serem tão especiais, por tornarem os meus dias mais felizes e por contribuírem de forma ímpar para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos amigos Gabriel Bastos e Luiz Fernando, por todos os auxílios prestados tanto na parte experimental e clínica como nas horas extra faculdade.

A minha namorada Julia, por ser responsável por minha alegria diária.

Aos funcionários do biotério: Aline, Massaro e Serginho, pessoas incríveis que tive o prazer de conviver.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) da Universidade de São Paulo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

A todos os funcionários da FORP, por todo carinho e boa vontade, especialmente Tatiana, Dulce, Daniela, Carla Daniela, Suely, Dona Laura, Isabel e Regiane.

RESUMO

RESUMO

VIEIRA, G. H. A.. **Dinâmica da resposta do hospedeiro na periodontite induzida por ligadura**. 2016. 109 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A periodontite é uma doença multifatorial, iniciada pela presença de biofilme bacteriano que interage com os mecanismos de defesa do hospedeiro e ocasiona resposta inflamatória quantificável exibindo destruição tecidual. As evidências indicam que a doença periodontal tem estados dinâmicos de exacerbação e remissão. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a dinâmica da resposta inflamatória ao longo de 45 dias, desde a indução da perda óssea experimental até a crônificação do processo, em modelo de doença periodontal induzido por ligadura. Cinquenta ratos receberam ligadura no 1º molar inferior e foram sacrificados nos seguintes tempos: 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30 e 45 dias. Após obtenção das amostras da mandíbula, as peças e as biópsias de gengiva foram processadas para obtenção das medidas histomorfométricas e análises microtomográficas e de expressão gênica. Os resultados confirmaram perda óssea progressiva e infiltrado inflamatório até o tempo de 20 dias ($p < 0.05$). Após 21 dias, observou-se a estabilização da perda óssea. Nos períodos iniciais, observou-se predominante expressão de genes pró-inflamatórios, relacionados com a destruição tecidual como: CCL2, CCL3, CCL4, IL1B, IL6, MMP-8, MMP-9 e, nos momentos tardios, uma maior expressão de genes anti-inflamatórios como IL4 e IL10. Através da análise de regressão linear observou-se que a MMP-8 está correlacionada com a expressão de IL1 β , TNFa, IL17, MCP1, MIP1a e MIP1b. A MIP1a está correlacionada com MMP2 e RANKL está correlacionada com IL1 β , IL17, IL-6, e MIP1b MIP1a. Correlações que mostram uma maior associação a perda óssea nos períodos ativos da doença induzida. Assim, conclui-se que a periodontite experimental, por um período de até 45 dias, passa pelas fases de exacerbação e remissão. Esse processo dinâmico pode ser monitorado por marcadores moleculares e morfométricos e contribuir para o melhor entendimento da patogênese da doença, contribuindo para a determinação do melhor momento para se avaliar cada biomarcador ou processo biológico.

Palavras Chave: Periodontite, Resposta inflamatória, Genes

ABSTRACT

ABSTRACT

VIEIRA, G. H. A.. **Dinâmica da resposta do hospedeiro na periodontite induzida por ligadura**. 2016. 109 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Periodontitis is a multifactorial disease initiated by the presence of bacterial biofilms that interacts with the defense mechanisms of the host and causes intense inflammatory response and tissue destruction. Evidence suggests that periodontal disease has dynamic states of exacerbation and remission. Fifty rats received ligation in 1 molar and were sacrificed at the following times: 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30 and 45 days, 6 rats per time evaluation. After obtaining the jaw samples, parts and biopsies gum form processed for histomorphometric measures analysis with microtomography and gene expression. Histological results showed microtomograficos and progressive bone loss and inflammation to the influx time of 20 days ($p < 0.05$). After this time it was observed stabilization of bone loss. In the initial periods observed expression of pro-inflammatory genes associated with tissue destruction as CCL2, CCL3, CCL4, IL1B, IL6, MMP8, MMP9 and late times greater expression of anti-inflammatory genes such as IL4 and IL10. Linear regression analysis was used to investigate the possible correlation between levels of MMP expression, FOXP3 and RANKL. MMP8 is correlated with IL1 β , TNFa, IL17, MCP1, MIP1a and MIP1b. MIP1a is also correlated with MMP2. RANKL is correlated with IL1 β , IL17, IL-6, and MIP1b MIP1a. Correlations that show a greater association with bone loss in active periods of induced disease. Experimental periodontitis, in a period of 45 days, passes through periods of exacerbation and remission. This dynamic process can be monitored by molecular and morphometric markers and contribute to a better understanding of the pathogenesis of the disease, helping to determine the best time to evaluate each biomarker, or biological process.

Key words: Periodontitis; Inflammatory response; Genes

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A) Animal posicionado para a colocação da ligadura; (B) Fio de algodão em posição para indução da doença periodontal no 1o. molar inferior. <i>Modificado de Oliveira, L.F.F et al 2016.</i>	37
Figura 2 - Análise Histomorfométrica - imagem ilustrativa dos tecidos periodontais da região interproximal entre o 1o. e 2o. molares inferiores de animais com doença periodontal. A linha vermelha representa a medida linear (mm) do nível de inserção conjuntiva (NIC). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original = 10x. JCE = junção cimento-esmalte; IC = inserção conjuntiva; PMI = primeiro molar inferior; SMI = segundo molar inferior.....	40
Figura 3 - Esquema para mensuração da área de tecido mole e tecido ósseo na região de bifurcação. A - grade retangular; B - área total dos tecidos (amarelo); C - área de tecido mole (amarelo) e D - área de tecido ósseo (amarelo)	40
Figura 4 Medidas lineares das distâncias (μm) entre a junção cimento-esmalte e a crista óssea alveolar realizadas nos cortes microtomográficos visualizados no eixo transaxial (A – Bifurcação e interproximal; B – lingual e vestibular) e no eixo sagital (D – bifurcação).....	42
Figura 5 -. Medidas volumétricas (μm^3) realizadas na região de bifurcação do primeiro molar inferior em cortes microtomográficos visualizados no eixo coronal. (A) a região de interesse a ser analisada (ROI) foi delimitada por um retângulo que tangenciava as quatro raízes do primeiro molar inferior. (B) as imagens foram binarizadas para separação das estruturas óssea e dentária (por diferença de densidade), utilizando uma escala de níveis de cinza (grayscale threshold 0-255) Modificado de Oliveira, L.F.F et al 2016.....	43
Figura 6 - Medidas de perda óssea linear região vestibular por micro ct. *diferença do respectivo controle.....	46
Figura 7 - Medidas de perda óssea linear região lingual por micro ct. *diferença do respectivo controle.....	46
Figura 8 - Medidas de perda óssea linear região bifurcação por micro ct. *diferença do respectivo controle.....	47
Figura 9 - Medidas de volume ósseo na região bifurcação por micro ct. *diferença do grupo controle; + difença do grupo 10 dias; # diferença do grupo 15 dias.....	48
Figura 10 - Medidas da razão BV/TV na região bifurcação por micro ct. *diferença do grupo controle; # diferença do grupo 15 dias.....	48
Figura 11 - Tecidos periodontais na região de bifurcação do 1o molar inferior dos grupos Controle (A, B), 10d (C, D), 15d (E, F), 20d (G, H), 30d (I, J) e 45d (L, M). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original = 10x (A, C, G, F, I, L); 20x (B, D, F, H, J, M)	50

Figura 12 - Medidas do nível clínico de inserção na região interproximal por histologia. * diferença do controle; # diferença do grupo 15 dias.	51
Figura 13 - Porcentagem de tecido ósseo na bifurcação dos primeiros molares inferiores. * diferença do respectivo controle.....	51
Figura 14 - Expressão gênica das MMP's durante o curso da doença periodontal induzida	54
Figura 15 - Expressão gênica das quimiocinas durante o curso da doença periodontal induzida	54
Figura 16 - Expressão gênica das interleucinas durante o curso da doença periodontal induzida	55
Figura 17 - Expressão gênica dos mediadores inflamatórios durante o curso da doença periodontal induzida	55
Figura 18 - Correlações das citocinas utilizando genemania.org. Linhas roxas representam co-expressão, as linhas vermelhas representam interação física e as linhas azuis as vias de interação baseadas em pathwaycommons-nci_nature and wu-stein-2010.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3d	Três dias
5d	Cinco dias
7d	Sete dias
10d	Dez dias
15d	Quinze dias
20d	Vinte dias
30d	Trinta dias
45d	Quarenta e cinco dias
<i>A.a</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
BSA	Bovine Albumin Serum
BV/TV	Volume ósseo/Volume tecidual
COX2	Ciclo-oxigenase-2
DP	Doença Periodontal
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>F.n</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
FORP-USP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
FOXP3	Forkhead box P3
g	Gramma
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IFN γ	Interferon gama
IL1 β	Interleucina 1 β
IL4	Interleucina 4
IL6	Interleucina 6
IL10	Interleucina 10
IL12	Interleucina 12
IL17	Interleucina 17
JCE	Junção-cimento-esmalte

Kg	Kilograma
M	Mol
MCP1	Proteína-1 quimiotática para Monócito
mg	Miligrama
min	Minuto
MIP1 α	Proteína-1 alfa inflamatória de macrófago
MIP1 β	Proteína-1 beta inflamatória de macrófago
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
MMPs	Metaloproteases de matriz
mW/cm ²	Miliwatt por centímetro quadrado
nm	Nanômetro
PBS	Phosphate Buffered Saline
<i>P.g</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
pg/mL	Picograma/mililitro
<i>P.i</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
PL	Ligamento periodontal
RANK	Receptor de ativação do fator nuclear Kappa-beta
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa-beta
Rpm	Rotação por minuto
TA	Temperatura ambiente
TIMPs	Inibidores teciduais das metaloproteases
USP	Universidade de São Paulo
W	Watts
Mg	Micrograma
µg/mL	Micrograma/mililitro
µL	Microlitro
µM	Micromêtro

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
>	Maior
<	Menor
nº	Número
%	Por cento
n	Tamanho da amostra

LISTA DE ANEXOS

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Certificados de aprovação do comitê de ética no uso de animais	1
Anexo B - Artigo científico submetido para publicação no Journal of Periodontal Research...	3
Anexo C - Artigo científico submetido para publicação no Journal Archives of Oral Biology	20

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	25
1.1 Papel das Citocinas na doença periodontal.....	26
1.2 Modelos de indução.....	29
2 PROPOSIÇÃO.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Amostra	36
3.2 Indução da Doença Periodontal (DP)	36
3.3 Processamento histológico	38
3.4 Análise histomorfométrica	39
3.5 Microtomografiacomputadorizada – μ CT	41
3.6 Análise da expressão gênica	43
3.6.1 Isolamento do RNA	43
3.6.2 Análise quantitativa da expressão gênica por Real-time RT-PCR	43
3.7 Análise estatística	44
4 RESULTADOS	46
4.1 Análise tridimensional	48
4.2 Análise histopatológica.....	49
4.3 Análise de Expressão Gênica	52
4.3.1 De 0 a 7 dias - Fase aguda	52
4.3.2 De 7 a 20 dias – Fase crônica à fase avançada	53
4.3.3 De 20 a 45 dias - Remissão Molecular em fase adiantada de destruição crônica	53
4.4 Análise da correlação entre a expressão de MMP, FOXP3 e RANKL com a expressão de citocinas em tecidos periodontais doentes	53
5 DISCUSSÃO	58
6 CONCLUSÃO.....	65
7 REFERÊNCIAS.....	67
ANEXOS.....	1

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A periodontite é uma doença infecciosa, caracterizada por um processo inflamatório crônico do periodonto, mediada e modulada pelo hospedeiro. As evidências indicam que a doença periodontal tem estados dinâmicos de exacerbação e remissão, a qual pode ser descrita em termos de padrões de progressão e regressão da doença. Esta patologia resulta na destruição do tecido conjuntivo gengival e dos tecidos de suporte dos dentes, sendo considerada a forma mais prevalente de patologia óssea nos seres humano.

Os primeiros estudos por Loe e colaboradores (Loe et al., 1967, Loe, 1967) demonstraram uma relação direta entre o acúmulo de placa bacteriana e doença gengival. Nestes estudos, os tecidos sem biofilme tinham pouca inflamação, enquanto que aqueles com biofilme exibiram uma forte reação inflamatória. Este processo era reversível, indicando uma correlação direta deste com a doença periodontal. Outros estudos, em animais, demonstraram uma relação entre o biofilme, inflamação e perda óssea periodontal (Jordan and Keyes, 1964, Saxe et al., 1967, Lindhe et al., 1975). Estes estudos iniciais estabelecem a etiologia bacteriana das doenças gengivais e periodontais.

Estudos mais recentes têm sugerido que a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias nos tecidos periodontais é um fator relevante para a determinação do curso e/ou severidade da doença. Uma resposta imune equilibrada frente ao biofilme bacteriano é crítica na manutenção de um periodonto saudável, sem causar danos aos tecidos (Roberts and Darveau, 2015). De outro modo, uma resposta inflamatória persistente desencadeada por biofilmes patogênicos leva à destruição dos tecidos periodontais, com a consequente perda de dentes (Van Dyke and Serhan, 2003).

Os mecanismos da resposta do hospedeiro nos tecidos periodontais são complexos e envolvem inúmeros sistemas de interações. Enquanto que a resposta imune inata é caracterizada por reações não específicas, a resposta adaptativa utiliza estratégias de reconhecimento, de memória e de ligação aos sistemas efetores na eliminação dos antígenos. É cada vez mais claro, no entanto, que as citocinas não funcionam de forma isolada, mas sim, em redes complexas envolvendo efeitos pró e anti inflamatórios. Focar-se apenas nas funções isoladas de um marcador pode limitar os progressos na melhoria da compreensão desta doença inflamatória tão comum como complexa. (Berglundh and Donati, 2005, Preshaw and Taylor, 2011)

De modo a avaliar tanto a patogênese da doença periodontal quanto as diversas modalidades de tratamento, diferentes modelos animais de periodontite experimental têm sido

propostos e utilizados. O benefício do uso destes modelos resulta no fato de que eles permitem uma avaliação da doença de uma forma longitudinal, com características de início e progressão semelhantes em diversos animais, além de permitir análises da composição celular e molecular dos tecidos envolvidos.

Outro foco de interesse é o diagnóstico precoce da doença periodontal, antes mesmo dos sinais clínicos de perda de inserção conjuntiva e perda óssea. Nessa linha, os biomarcadores diagnósticos são moléculas potenciais para a identificação do processo destrutivo da doença, ainda nas fases incipientes da patogênese. No entanto, essa fase é repleta de alterações moleculares relacionadas à ativação e inibição de vias e produção de proteínas de interesse diagnóstico, que podem estar expressas ou inibidas dependendo da fase da patogênese periodontal.

Desta forma, trabalhos que avaliem a progressão e características celulares e moleculares, com auxílio de modelos de indução da periodontite, podem ser úteis na elucidação da patogênese das doenças periodontais, identificação do pico de expressão de potenciais biomarcadores diagnósticos, momento ideal para modulação da resposta e escolha de tratamentos adjuvantes.

1.1 Papel das Citocinas na doença periodontal

A periodontite é uma doença complexa, com múltiplos componentes causais, alguns com sua base na genética ou causados por influências epigenéticas e outros que são modificáveis, pois referem-se ao comportamento dos pacientes, medicamentos ou fatores ambientais, todos estes fatores juntos podem conspirar para estabelecer e propagar a lesão periodontal. (Meyle and Chapple, 2015)

O fenótipo periodontal é caracterizado por uma inflamação exagerada, pouco eficaz e não resolutive do tecido conjuntivo, que suporta os dentes, levando à sua destruição. Já na saúde periodontal ocorre uma resposta imune inflamatória, especificamente, orientada, eficaz e de auto-resolução.

Apesar do biofilme patogênico ser um pré-requisito necessário para o desenvolvimento da periodontite, ele por si só é insuficiente para causar a doença. A doença resulta de interações complexas entre o biofilme e a resposta imune inflamatória, sendo esta última responsável por quase 80% dos danos nos tecidos periodontais (Grossi et al., 1995).

A resposta inflamatória é caracterizada pela infiltração dos tecidos por neutrófilos, macrófagos e linfócitos, e a geração de altas concentrações de citocinas, eicosanoides e outros

mediadores destrutivos localmente, tais como as metaloproteinases de matriz (MMPs) (Preshaw and Taylor, 2011). A inflamação é regulada pela expressão de mediadores, que causam um número de eventos, culminando no recrutamento pleiotrópico de células inflamatórias e liberação de mediadores biológicos por leucócitos (Assuma et al., 1998).

Estes mediadores, as citocinas, têm interações moleculares gerais que são relevantes para muitos aspectos da imunidade e inflamação. É claro que, na patogênese periodontal, as citocinas têm amplas e variadas funções, como seria de se esperar, em qualquer tecido exposto a um desafio bacteriano crônico e em que há uma inflamação crônica persistente (Graves et al., 2011).

As citocinas são proteínas solúveis, que se ligam a receptores específicos, em células alvo e iniciam cascatas de sinalização intracelulares, resultando em alterações fenotípicas na célula, através da regulação genética. Elas são eficazes em baixas concentrações, são produzidas transitoriamente nos tecidos e atuam, principalmente, nos tecidos em que são produzidas. As citocinas induzem a sua própria expressão de uma maneira autócrina ou parácrina e tem efeitos pleiotrópicos sobre um grande número de tipos de células. Elas desempenham um papel fundamental na inflamação, incluindo na doença periodontal (Hughes, 1995).

A interleucina-1 (IL-1) tem sido a citocina mais estudada até hoje. Ela foi descrita, pela primeira vez, como fator ativador de osteoclastos (Horton et al., 1972). A partir de modelos humanos e em animais, há fortes evidências da função da IL-1 na mediação da perda óssea, estimulada por agentes patogênicos periodontais. Nos seres humanos, a expressão IL-1b foi elevada no fluido crevicular gengival, em locais com perda óssea e de inserção em pacientes com doença periodontal (Graves, 2008). Usando um modelo de primata não humano, Delima et al. mostraram que a inibição de IL-1 utilizando receptor humano da IL-1 solúvel de tipo I (IL-1R) reduziu significativamente a inflamação, a perda de inserção conjuntiva e reabsorção óssea induzida por agentes patogênicos periodontais em comparação com controles. (Delima et al., 2001)

O papel de outras citocinas, prostanóides e enzimas destrutivas na patogênese periodontal também tem sido investigado. O fator de necrose tumoral- α (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória, que induz a reabsorção óssea e regula, positivamente, a secreção de prostaglandina E2 (PGE2) e MMPs. IL-1B e TNF- α são produzidos por diversos tipos de células no periodonto. Eles induzem a regulação positiva de moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais, que estimulam a produção de quimiocinas (que recrutam leucócitos circulantes para os locais de inflamação) e induzem a expressão de outros

mediadores inflamatórios que potenciam respostas inflamatórias, tais como as prostaglandinas e as MMPs (Graves et al., 2011). A osteoclastogenese induzida por *P. gingivalis* foi reduzida em camundongos deficientes para receptor de TNF- α em comparação com os controles, indicando que a formação de osteoclastos resultou da estimulação da resposta do hospedeiro, ao invés do efeito direto da infecção bacteriana (Garlet et al., 2007).

TNF- α e IL-1B parecem induzir a expressão de diversas MMPs em macrófagos e linfócitos (Liacini et al., 2005). As MMPs são mediadores importantes da destruição de tecido conjuntivo periodontal, entre elas podemos destacar as MMP-1, -3, -8, -9 (Birkedal-Hansen, 1993). A MMP-1 pode iniciar a destruição da matriz extracelular e coopera com outras MMPs na degradação do colágeno (Woessner and Gunja-Smith, 1991). Sendo responsável por maior parte da atividade da collagenase expressa por fibroblastos gengivais cultivados (Sakaki et al., 2004). Um aumento da expressão do mRNA de MMP-1, juntamente com o de MMP-3, tem sido demonstrado na periodontite (Kubota et al., 1996). A expressão aumentada de mRNA para a MMP-8 (Tonetti et al., 1993) e MMP-9 (Makela et al., 1994) também tem sido relatado na gengiva humana inflamada. MMP-8 e MMP-9 são sintetizadas, principalmente, por leucócitos polimorfonucleares (PMN) (Birkedal-Hansen, 1993). MMP-8 é a principal collagenase no fluido crevicular gengival inflamado (Sorsa et al., 1999), e sua regulação mediada por IL-1 pode contribuir para a periodontite grave (Abe et al., 2001). A expressão geral de MMP-9, também, apresenta-se aumentada na periodontite (Birkedal-Hansen, 1993).

As quimiocinas, que são uma classe de citocinas quimiotáticas, que estimulam o recrutamento de subconjuntos específicos de leucócitos (Graves, 1999). As quimiocinas são mediadores inflamatórios secundários que são induzidos por sinais externos, tais como IL-1 ou TNF, fatores de crescimento, infecções virais e bacterianas ou os seus produtos. Quimiocinas são fisiologicamente significativas desde a sua expressão o que pode explicar a presença de diferentes tipos de leucócitos observadas em várias condições normais ou patológicas. Há quatro famílias de quimiocinas, com base nos primeiros resíduos de cisteína, dos quais existem duas grandes famílias: as CXC e CC quimiocinas (Sallusto and Baggiolini, 2008).

Quimiocinas CC incluem proteínas de monócitos 1, 2 e 3 (MCP-1, MCP-2 e MCP-3, proteínas inflamatórias de macrófago, MIP1A (ccl3), MIP1b (ccl4) . MCP-1, também conhecida como quimiocina CC ligante 2 (CCL-2) é um dos mais potentes quimioatraente para monócitos (Rossi and Zlotnik, 2000). Ele é produzido por uma variedade de tipos de células em resposta a sinais diferentes, tais como, o TNF- α , interleucina-1 beta (IL-1B) e interferon gama (IFN- γ) (Colotta et al., 1992). A expressão acentuada do gene da MCP-1 tem

sido observada em tecido gengival de pacientes, com periodontite crônica, sugerindo o seu papel predominante na atividade quimiotática de monócitos no fluido crevicular gengival (GCF) (Gupta et al., 2013). Em outro estudo, células produtoras de MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, foram detectadas em todas as amostras de tecido gengival inflamado (Yu et al., 1993). Já a CCL3 é uma quimiocina biologicamente ativa, que é conhecida, principalmente, como um agente quimiotático para monócitos. CCL3 é secretada por células inflamatórias, mas atua também estimulando osteoclastos (Taddei et al., 2013). CCL3 aumenta a motilidade dos osteoclastos maduros, mas não altera a suas atividades de reabsorção e adesão. Estudos longitudinais demonstraram que CCL3 pode ser usado como um biomarcador salivar de perda óssea (Yu et al., 2004).

As citocinas e quimiocinas não atuam isoladamente, mas em conjunto com outras vias de sinalização e, em particular, com as interações célula-a-célula, através de apresentação de antígeno, também exercem função de moléculas co-estimuladoras. As citocinas geradas neste último conceito são importantes para a função e diferenciação das células T. As células T virgens podem diferenciar-se em células T auxiliares do tipo 1 (Th1), ou em células Th2 para proporcionar auxílio para as células B, ou em células Th17, que podem amplificar as respostas pró-inflamatórias, ou em células T reguladoras (células Treg), que amortecem as respostas imunes. Células T regulatórias secretam fator de crescimento transformante b (TGF-b) e IL-10 tendo um papel na regulação de outros subconjuntos de células T (Th1 e Th2) e na manutenção da tolerância contra os auto antígenos, evitando assim a auto-imunidade (Josefowicz and Rudensky, 2009). Foxp3 é um fator de transcrição, ligado ao X, pertencente à família forkhead, que é essencial para o desenvolvimento e função de células T reguladoras (Fontenot et al., 2003).

Coletivamente, esses dados revelam a complexidade das vias de sinalização das citocinas em resposta ao biofilme. Por isso, ainda, não temos conhecimento real de como estes se relacionam com a resposta do hospedeiro geral e qual a sua importância em relação à patogênese periodontal, bem como, qual o momento exato, durante a progressão da doença, em que eles ocorrem.

1.2 Modelos de indução

Diante das dificuldades e limitações dos estudos, em humanos, sobre a doença periodontal para estabelecer relações causais entre os vários fatores de destruição periodontal. Então os modelos animais são necessários para comprovar as relações de causa e efeito e para

testar o potencial de novas terapias. Embora os modelos animais, incluindo os de doença periodontal não sejam perfeitos, as limitações oriundas da abordagem de questões mecanicistas, geralmente, não são tão graves como os estudos *in vitro* ou estudos clínicos. Uma característica fundamental de modelos animais é a capacidade de examinar as interações complexas do hospedeiro-bactérias, que não podem ser realizadas com uso de populações de organismos unicelulares, sob condição artificial (Hajishengallis et al., 2015).

Os modelos periodontite mais comuns envolvem procedimentos de gavagem oral, colocação de ligaduras e injeção de lipolissacarídeo (LPS) bacteriano.

No modelo de gavagem oral ocorre a introdução de cepas de bactérias humanas, por gavagem oral e subsequente impacto sobre o periodonto foi estudado em diversos modelos de roedores (Chang et al., 1988, Klausen, 1991, Baker et al., 1994). Um modelo reprodutível de periodontite com ratos foi desenvolvido no qual gavagem oral com *P. gingivalis* induz a perda de osso alveolar (Baker et al., 1994, Baker et al., 2000). A indução de perda óssea, neste modelo, foi replicado usando outros patógenos periodontais, incluindo *A. Actinomycetemcomitans* (Garlet et al., 2006), *Tannerella forsythia* (Sharma et al., 2005) e *Porphyromonas gulae*, um agente patogênico animal periodontal, considerado equivalente ao *P. gingivalis* humanos (Hardham et al., 2005). Tipicamente, em uma espécie de camundongo susceptíveis, tais como BALB/cByJ, é administrado por via oral uma suspensão viscosa (com 2% de carboximetilcelulose) contendo bactérias. A reprodutibilidade e previsibilidade é reforçada por um tratamento prévio, com antibióticos, para reduzir a flora bucal e com inoculações repetidas do organismo implantado (por exemplo, três vezes, a intervalos de 2 dias, com 10^9 CFU). A perda óssea substancial, tipicamente leva mais do que quatro semanas para se desenvolver e pode ser quantificada histologicamente, por análise morfométrica ou por microtomografia computadorizada (Garlet et al., 2006, Wilensky et al., 2005, Hart et al., 2004). Para a avaliação da perda óssea, os investigadores examinam, mais frequentemente, o osso, em torno dos molares superiores, pois a indução da perda óssea na mandíbula é mais lenta, ao passo que, os incisivos não são incluídos na avaliação devido à sua erupção contínua. Em muitos estudos, os camundongos são sacrificados seis semanas após a dose final da infecção (Baker et al., 2000, Baker et al., 1994, Yu et al., 2007), embora pareça razoável a utilização de tempos mais recentes. Numa abordagem analítica o tecido gengival bucal e lingual, em torno dos molares superiores, são dissecados para a determinação da expressão de citocinas por RNA (Hart et al., 2004) e/ou o nível de proteína (Garlet et al., 2006) e perda óssea quantificados através de exame macro ou microscópico.

Entretanto o modelo de gavagem oral pode ser complexo e ter um custo considerável. Devido à complexidade deste modelo há casos em que os resultados precisam ser interpretados com cautela, pois as modificações genéticas, em camundongos, podem afetar uma série de parâmetros, incluindo a colonização, invasão, modificações nos eventos inflamatórios, reparação ou todos os quatro.

No modelo de ligadura, um fio de seda é amarrado em torno dos dentes, fazendo com que ocorra um acúmulo de placa e este facilite a penetração de bactérias no sulco gengival, o que conduz à inflamação e reabsorção do osso alveolar (Graves et al., 2008). A colocação da ligadura, em torno de dentes, como fator iniciador da perda de tecido periodontal tem sido utilizado em diversos tipos de animais. A ligadura conduz a um maior acúmulo de placa e ulceração do epitélio sulcular, facilitando a invasão do tecido conjuntivo. Embora este modelo já tenha sido utilizado com primatas não-humanos, é utilizado com menos frequência, devido às despesas e dificuldade na realização de experiências com esses animais. Por muitos dos mesmos eventos em série que ocorrem com primatas não humanos ocorrerem no rato, tem havido um interesse renovado no modelo de ligadura em roedores, principalmente, por ser mais simples de trabalhar e menos dispendiosa (Rovin et al., 1966).

Semelhante a periodontite humana, pensa-se ser a penetração bacteriana no tecido do hospedeiro, um fator crucial que afeta a perda de osso alveolar no modelo de ligadura. A perda de inserção periodontal e reabsorção do osso alveolar ocorre, previsivelmente, num período de sete dias no rato (Aas et al., 2005, Garlet et al., 2006), embora algumas experiências foram conduzidas para períodos mais longos de tempo (Holt et al., 1988, Craig et al., 2003, Haffajee and Socransky, 2005).

Avaliando se a ligadura por si só apresentaria um dano, utilizou-se o modelo de ligadura em ratos gnotobioticos, animais que possuem flora microbiológica conhecida, não existente ou não detectável, concluindo-se que a ligadura sozinha foi incapaz de iniciar inflamação gengival ou perda óssea significativa nestes ratos (Rovin et al., 1966). Demonstrando, novamente, o papel essencial das bactérias como um gatilho de iniciação. Novos estudos, com outros modelos animais, também reforçam a relação entre bactérias e doença periodontal. Por exemplo, o tratamento de animais com antibióticos ou aplicação tópica de clorexidina reduz a carga bacteriana e reduz significativamente a reabsorção óssea (Weiner et al., 1979, Kenworthy and Baverel, 1981, Gyorfí et al., 1994).

Além da associação bacteriana, o modelo de ligadura é capaz de demonstrar a participação da resposta do hospedeiro na periodontite. Como na periodontite em humanos, a fase destrutiva da periodontite experimental está associada com a resposta do hospedeiro,

mostrado pela formação de um infiltrado inflamatório na gengiva, antes da reabsorção óssea (Gyorfi et al., 1994, Samejima et al., 1990). O papel funcional da resposta inflamatória é demonstrada pela diminuição da destruição periodontal em ratos, tratados com inibidor de prostaglandina. Um inibidor COX-1 / COX-2, a indometacina reduz a inflamação gengival, a formação de osteoclastos e a perda óssea, neste modelo (Bezerra et al., 2000).

Como as bactérias gram negativas são consideradas importante patógenos periodontais. O LPS da parede celular destes microrganismos é um estímulo inflamatório significativo que provoca uma resposta imune inata. Desta forma a injeção destes LPS no tecido gengival é utilizada como modelo de verificação da resposta imune inata e osteoclastogênese e perda óssea (Jordan and Keyes, 1964). Este modelo reproduz aspectos histopatológicos semelhantes aos dos outros modelos e ao observado na doença periodontal em humanos, caracterizados pelo aumento do infiltrado inflamatório, degradação do colágeno e perda óssea. Tipicamente, uma quantidade definida de LPS bacteriano purificado suspenso em pequenos microvolumes (1-6 μ l) é injetado nos tecidos gengivais que rodeiam os dentes posteriores de roedores, tanto ratos como camundongos (Graves et al., 2012). O local de injeção utilizado é o aspecto palatal dos primeiros molares superiores, mas alguns estudos também têm realizado as injeções na papila interdental entre primeiros e segundos molares inferiores (Nishida et al., 2001, Dumitrescu et al., 2004). Estas injeções são efetuadas sob anestesia geral, normalmente 3 vezes por semana durante o período experimental. A perda óssea alveolar foi observada em até 7 dias após o início das injeções de LPS com origem de vários microrganismos, incluindo *Escherichia coli*, *A. actinomycetemcomitans* e *Salmonella typhimurium*, o que sugere que a fonte de LPS pode não afetar significativamente este resultado particular. A maioria dos estudos usaram períodos experimentais de 3-8 semanas (Graves et al., 2012).

Assim, ao passo que nenhum modelo de um animal pode recapitular a complexidade da doença periodontal, diferentes aspectos da doença podem ser representadas por diferentes modelos, que têm contribuído, consideravelmente, em dissecar a base da patogênese da periodontite.

PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

Objetivo primário:

Avaliar a dinâmica da resposta inflamatória do hospedeiro durante o curso da doença periodontal induzida por ligaduras por meio da expressão de genes de interesse .

Objetivos específicos:

1. Avaliar os eventos celulares relacionados aos processos inflamatório e de destruição tecidual;
2. Avaliar a expressão de genes de interesse com foco na caracterização dos eventos biológicos da doença periodontal.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto de pesquisa foi submetido à avaliação da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Campus da USP-Ribeirão Preto, tendo sido aprovado (processo número: 2013.1.709.58.6 (aprovado em 28 de março de 2013).

3.1 Amostra

Foram selecionados 50 ratos, adultos, machos, do tipo Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com peso entre 200 a 250 g, provenientes do biotério central da FORP-USP. Foram utilizados somente ratos machos, com vistas a evitar a influência das variações hormonais sobre o processo de reparo ósseo. Os animais foram mantidos em caixas plásticas apropriadas, com alimento (ração triturada) e água *ad libitum* antes e durante o período experimental, e permaneceram no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, FORP-USP, em ambiente com ciclo de 12 horas de luz e temperatura entre 22 e 24°C.

3.2 Indução da Doença Periodontal (DP)

A Indução da DP foi realizada utilizando-se de um modelo já descrito na literatura, que mimetiza diversos achados da periodontite humana, incluindo biofilme bacteriano, formação de infiltrado inflamatório, perda de inserção conjuntiva e de osso alveolar (Rovin et al 1969). Os animais foram, primeiramente, pesados para o correto cálculo da dose anestésica. Após anestesia intraperitoneal com a associação de ketamina e xilazina (4:3, aplicação de 100-130 µL/100g do animal): Ketamina (74,1 mg/Kg - Cloridrato de Cetamina a 10% - Agener, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu – SP, BR) e Xilazina (11,2 mg/kg – Dopaser, Laboratórios Calier S/A, Barcelona, Espanha) os animais foram posicionados na mesa cirúrgica (Bonter Equipamentos para Ensino e Pesquisa, Ribeirão Preto, BR).

Figura 1. A) Animal posicionado para a colocação da ligadura; (B) Fio de algodão em posição para indução da doença periodontal no 1o. molar inferior. *Modificado de Oliveira, L.F.F et al 2016*

Subsequentemente, com auxílio de sonda exploradora e porta agulha, ligaduras (fio de algodão nº 24, Coats Corrente, São Paulo, BR) foram inseridas na região subgingival dos primeiros molares inferiores, para indução da DP por meio do acúmulo de biofilme bacteriano. (Figuras 1).

Os animais foram acompanhados, diariamente no período, após a instalação das ligaduras, para que fosse observado o comportamento dos mesmos, bem como sua alimentação e hidratação. Caso houvesse qualquer sinal de sofrimento do animal, este seria excluído do estudo e sacrificado por aprofundamento anestésico com Tiopental Sódico 150mg/kg (Thiopentax, Cristália, Brasil) via intraperitoneal. Não foram administrados anti-inflamatórios e antibióticos, pois os mesmos poderiam influenciar nos resultados do estudo.

Os animais foram divididos, aleatoriamente, em 10 grupos experimentais, cada qual contendo 5 ratos, que diferiam entre si, pelo tempo de eutanásia e avaliando assim a progressão da doença nos seguintes tempos:

- Grupo DP-1: um dia após a indução da doença periodontal (n=5);
- Grupo DP-3: três dias após a indução da doença periodontal (n=5);
- Grupo DP-5: cinco dias após a indução da doença periodontal (n=5);
- Grupo DP-7: sete dias após a indução da doença periodontal (n=5);
- Grupo DP-10: dez dias após a indução da doença periodontal (n=5);
- Grupo DP-15: quinze dias após a indução da doença periodontal (n=5);
- Grupo DP-20: vinte dias após a indução da doença periodontal (n=5);
- Grupo DP-30: trinta dias após a indução da doença periodontal (n=5);
- Grupo DP-45: quarenta e cinco dias após a indução da doença periodontal (n=5);

- Grupo controle: sem indução da doença periodontal (n=5).

Os animais foram eutanasiados com aprofundamento anestésico de Tiopental Sódico 150mg/kg (Thiopentax, Cristália, Brasil) via intraperitoneal nos períodos correspondentes ao seu tempo experimental.

3.3 Processamento histológico

Inicialmente, realizou-se a dissecação das mandíbulas para se remover a área de interesse e os tecidos moles circunvizinhos envolvidos na pesquisa. Estas foram então seccionadas, de modo que, cada bloco contivesse o dente de interesse e seus tecidos circunjacentes. As hemi-mandíbulas foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Merck & Co. Inc., New Jersey, USA) em pH 7 por um período de 24 a 48 horas. A seguir, cada peça foi envolvida em gaze, identificada e colocada suspensa em um recipiente (Becker) contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético - Merck) a 4%, pH 7,4, sobre um agitador magnético, a fim de ser descalcificada por múltiplos banhos. Foi utilizado um volume de solução 10 vezes maior que o da peça, e esta solução foi trocada duas vezes por semana.

Após o período de descalcificação as peças foram lavadas exaustivamente em água corrente e depois em água destilada. Subsequentemente, foi realizada a desidratação, em concentrações crescentes de etanol (Merck): 50% durante a noite, duas horas e meia a 70%, 80% e 90%, e, novamente, durante a noite, a 95%. No dia seguinte: duas horas no etanol absoluto I, três horas no etanol absoluto II e, finalmente, três horas no etanol absoluto III. Após isso, as peças foram deixadas durante a noite em uma mistura (1:1) de etanol absoluto e benzol (Merck). Subsequentemente, as peças foram incubadas em três banhos sucessivos, de uma hora e meia, em benzol. Em seguida, foram realizados os banhos de parafina: duas horas na parafina I e duas horas na parafina II. Por fim, as peças foram incluídas em parafina aquecida a 60°C. A inclusão das peças foi realizada de maneira padronizada, com o auxílio de uma inclusora Histo Embedder (Leica Reichert & Jung Products - Heildelberg, Alemanha). Posteriormente, cortes seriados de 6 mm na direção mesio-distal foram obtidos e montados sobre lâminas de vidro. Os cortes foram, então, desparafinizados em xilol (Merck), hidratados em série decrescente de etanol (5 minutos em cada: 100% - duas vezes, 95%, 90%, 80%, 70% e 50%), lavados em água destilada e corados com hematoxilina e eosina. Após as colorações, as lâminas foram desidratadas em série crescente de etanol (2 minutos em cada concentração de etanol): 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%. Finalmente, as lâminas foram diafanizadas

com xilol (2 vezes de 5 minutos) e montadas com Permunt (Thermo Fischer Scientific, Hanover Park, IL, USA).

3.4 Análise histomorfométrica

Para a análise histomorfométrica os cortes histológicos (2 por bloco), representando a porção vestibulo-lingual central da hemi-mandíbula, foram fotografados, utilizando um microscópio trinocular para campo claro e fluorescência (modelo DMLB, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Heidelberg, Alemanha) com objetiva de 2,5, acoplado a uma câmera DFC300FX. A mensuração da perda óssea foi realizada com auxílio de um *software* de aquisição e análise de imagens LAS versão 4.1.0 (Leica, Solms, Germany). Foram realizadas, na raiz distal do 1º molar inferior, medidas lineares para avaliar o nível de inserção conjuntiva (NIC), o qual foi calculado, mensurando-se em mm a distância entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a inserção conjuntiva (Figura 2).

Para avaliar as medidas da área de perda óssea alveolar, na região de bifurcação (avaliação percentual de tecido mole e tecido ósseo presentes na área da bifurcação) foi confeccionada uma grade retangular padronizada (Figura 3), apresentando uma área de 1,5 mm², posicionada em sua linha coronal, de forma a coincidir com o teto da bifurcação dos primeiros molares inferiores. A área, entre as raízes, delimitada, apicalmente, pela base do retângulo, foi considerada como área total (100%); a partir daí, foram medidos os valores percentuais internos a essa grade de tecido mole e tecido ósseo. O valor das medidas de área do animal também foi dado pelo valor médio das duas lâminas avaliadas (tecido mole e tecido ósseo). Todas as medidas foram realizadas por um examinador calibrado e cego para os grupos experimentais.

Figura 2. Análise Histomorfométrica - imagem ilustrativa dos tecidos periodontais, da região interproximal, entre o 1o. e 2o. molares inferiores de animais com doença periodontal. A linha vermelha representa a medida linear (mm) do nível de inserção conjuntiva (NIC). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original = 10x. JCE = junção cimento-esmalte; IC = inserção conjuntiva; PMI = primeiro molar inferior; SMI = segundo molar inferior.

Figura 3. Esquema para mensuração da área de tecido mole e tecido ósseo na região de bifurcação. A - grade retangular; B - área total dos tecidos (amarelo); C - área de tecido mole (amarelo) e D - área de tecido ósseo (amarelo).

3.5 Microtomografia computadorizada – μ CT

Após o sacrifício dos animais, as hemimandíbulas do lado direito foram removidas ($N = 5$ para cada grupo), fixadas em formol a 10%, durante 24 horas e, depois, foram transferidas para uma solução de álcool 70% e armazenadas em temperatura ambiente. Os espécimes foram escaneados, utilizando um sistema de microtomografia computadorizada (Skyscan 1174, Aartselaar, Belgium).

Método de escaneamento: Os parâmetros utilizados da tomografia computadorizada foram os seguintes: o tamanho da imagem em pixel foi de $2000 \times 60 \times 1336$ ($18 \mu\text{m}$); a espessura dos cortes foi de $12 \mu\text{m}$; a magnificação da imagem foi de $10\times$; a voltagem do tubo de raios-X foi de 50 kV e o feixe foi de 496 μA e a corrente elétrica foi ajustada para 0.1mA. As imagens tridimensionais foram reconstruídas, utilizando um software de reconstrução (NRecon 1.6.1.5 – SkyScan N. V. Belgium). Os parâmetros para reconstrução foram: Beam Hardening Correction 4%, Ring Artifact Correction =3, Smoothing =1, Postalignment =1.00.

Análise linear (2D): Para a realização da análise linear foi utilizado um software bidimensional (Data Viewer 1.4.3.1 - SkyScan, Belgium) que possibilitou a visualização e a quantificação da perda óssea alveolar por meio de um computador. Todos os cortes

escaneados foram reorientados em três planos: frontal, coronal e transaxial, antes de cada análise, para alinhar uniformemente a posição anatômica, ou seja, mesial-distal, vestibular-palatina e medial e lateral (Figura 4). A medida da perda óssea alveolar foi determinada (em mm) a partir da junção cimento-esmalte (JEC) até a crista óssea alveolar (COA) na região distal da raiz disto-lingual do primeiro molar e na região mesial da raiz mesial do segundo molar (Figura 4). As imagens nos cortes frontais foram reorientadas para que tanto a JCE como o ápice da raiz aparecesse no mesmo corte tomográfico padronizando assim, todas as imagens.

Figura 4 - Medidas lineares das distâncias (μm) entre a junção cimento-esmalte e a crista óssea alveolar realizadas nos cortes microtomográficos visualizados no eixo transaxial (A – Bifurcação e interproximal; B – lingual e vestibular) e no eixo sagital (D – bifurcação).

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

Para maximizar a quantificação do osso, minimizar a inclusão de dentes e raízes e usar o mínimo de marcações possíveis, o ROI foi delimitado no sentido mesio-distal a partir da raiz mesial do primeiro molar até a raiz distal do primeiro molar, e no sentido cervico-apical englobando todo o teto da bifurcação do primeiro molar até 500 μm apical a esta estrutura anatômica. Assim, toda a área óssea da região interradicular da bifurcação do primeiro molar foi envolvida no ROI (Figura 5). Esta região foi escolhida por ser mais consistente entre os espécimes e pelo fato de que a colocação da ligadura foi ao redor dessa região. Utilizando uma ferramenta avançada para o desenho do ROI, o contorno 2D foi desenhado em intervalos

regulares (a cada 12 planos) para minimizar o efeito da variabilidade do contorno da raiz. Depois, um ROI 3D foi criado utilizando um software (CT Analyser 1.10.1.0 - SkyScan, Belgium) baseado na resultante do contorno 2D. A partir daí, os parâmetros de fração do volume ósseo foram determinados. As análises foram realizadas por um examinador cego calibrado.

Figura 5 - Medidas volumétricas (μm^3) realizadas na região de bifurcação do primeiro molar inferior, em cortes microtomográficos, visualizados no eixo coronal. (A) a região de interesse a ser analisada (ROI) foi delimitada por um retângulo que tangenciava as quatro raízes do primeiro molar inferior. (B) as imagens foram binarizadas para separação das estruturas óssea e dentária (por diferença de densidade), utilizando uma escala de níveis de cinza (grayscale threshold 0-255). *Modificado de Oliveira, L.F.F et al 2016*

3.6 Análise da expressão gênica

O tecido gengival das hemi-mandíbulas direitas foi removido para realização da análise de expressão gênica. Com bisturi estéril, a gengiva foi removida da região vestibular e lingual dos 1^o molar inferior de cada animal. Sendo transferida no criotubo em nitrogênio líquido e então armazenada em freezer -80^o.

3.6.1 Isolamento do RNA

O RNA foi isolado das biópsias pelo kit de extração SV Total RNA Isolation System (PROMEGA, USA) conforme protocolo do fabricante, incluindo tratamento com DNase para eliminar qualquer resíduo de DNA genômico.

3.6.2 Análise quantitativa da expressão gênica por Real-time RT-PCR

Um micrograma do RNA total isolado foi transcrito reversamente para cDNA com o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, USA) que contém random hexameros conforme protocolo do fabricante.

A análise da expressão gênica dos genes inflamatórios: IL1 β , TNF α , TGF β , IL12, IL17, MCP1, MIP1 α , MIP1 β , COX2, MMP2, MMP8, MMP9, IL10, IL6, IL4, IFN α , FOXP3 e RANKL foram realizadas por Real-time RT-PCR, utilizando TaqMan GenEx Assay (Applied, USA). Para isto, cada cDNA foi amplificado, utilizando o gene constitutivo β -actina como gene de referência para a normalização. A amplificação foi realizada no termociclador StepOnePlus (Applied, USA) por 40 ciclos, conforme protocolo do fabricante. A fluorescência foi coletada para cada ciclo de amplificação e os dados analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para quantificação da expressão relativa (Livak e Schmittgen, 2001).

3.7 Análise estatística

As análises foram realizadas com o software Bioestat (BioEstat, Versão 5.3. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brazil). O animal foi considerado como a unidade estatística ($n = 50$). Foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram agrupados e apresentados como médias e desvios-padrão (variáveis contínuas). A distribuição dos dados foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk. Para os dados que apresentaram distribuição normal, foram selecionados testes paramétricos para análises das diferenças intergrupos. Testes não paramétricos foram aplicados para os dados com distribuição não normal.

A significância das diferenças entre os grupos para as medidas volumétricas foram determinada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de Tukey. Para a análise da expressão gênica as diferenças entre os grupos testados foram avaliadas pelo teste-t de Student. Os resultados considerados estatisticamente significantes possuíam o valor $p < 0,05$. A análise de regressão linear foi utilizada para testar possíveis correlações entre os níveis de expressão das citocinas. Também foi usado o GENEMANIA uma interface da web para verificar hipóteses sobre as funções e as vias de interações dos genes.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Análise linear micro ct

A doença periodontal causou perda óssea progressiva até o vigésimo dia tendo seu potencial diminuído nos períodos posteriores.

As figuras 6 a 8 mostram os valores médios de perda óssea linear na região vestibular, lingual e bifurcação respectivamente. Todos os grupos apresentaram diferenças significantes quando comparado ao seu respectivo controle ($p < 0,05$).

Figura 6 - Medidas de perda óssea linear região vestibular por micro ct. * diferença do respectivo controle

Figura 7 - Medidas de perda óssea linear região lingual por micro ct. * diferença do respectivo controle.

Figura 8 - Medidas de perda óssea linear região da bifurcação por micro ct. * diferença do respectivo controle.

4.2 Análise tridimensional

Através da análise 3d da região de bifurcação (CEJ ao desaparecimento total da raiz), levando-se em consideração o parâmetro de volume de osso (BV) e a razão entre volume ósseo e o volume do tecido (BV/TV), foi observado um remanescente ósseo, significativamente menor, até o vigésimo dia (Figura 9 e 10). A doença periodontal induzida por ligadura progrediu até o vigésimo dia e após isso observou-se uma diminuição do padrão de progressão da doença periodontal.

Figura 9 - Medidas de volume ósseo na região bifurcação por micro ct. * diferença do grupo controle; + difença do grupo 10 dias; # diferença do grupo 15 dias.

Figura 10 - Medidas da razão BV/TV na região bifurcação por micro ct. * diferença do grupo controle; # diferença do grupo 15 dias.

4.3 Análise histopatológica

Em todos os grupos de controle, ligamento periodontal (PL) apresentou uma grande quantidade de fibras colágenas, fibroblastos, vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório discreto. fibras de colágeno foram inseridos tanto em cimento e osso alveolar (Fig.11). O tecido ósseo da região de bifurcação apresentou algumas irregularidades na sua superfície (Fig.11). Em todos os grupos, foi observada integridade do epitélio juncional e sulcular na área de interproximal (Fig11).

Todos os grupos com periodontite apresentaram tecido conjuntivo com poucos fibroblastos, fibras colágenas desorganizadas, com edema intersticial e moderado infiltrado inflamatório crônico (Fig. 11). Nos grupos iniciais apresentou-se áreas do tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório intenso que consistiu principalmente de neutrófilos. O osso do septo inter-radicular e o cimento da raiz mostraram contornos exteriores irregulares e áreas de reabsorção até 20 dias (Figs.11). Um grave dano do epitélio juncional e sulcular e migração apical do epitélio juncional foram observadas na área interproximal (fig. 11). O infiltrado de neutrófilos mostrou-se aumentado até o tempo de 20 dias. Após esse tempo, foi observado um infiltrado menos extenso.

Figura 11 - Tecidos periodontais na região de bifurcação do 1o molar inferior dos grupos Controle (A,

B), 10d (C, D), 15d (E, F), 20d (G, H), 30d (I, J) e 45d (L, M). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento original = 10x (A, C, G, F, I, L); 20x (B, D, F, H, J, M). Análise histométrica

As médias e os desvios-padrão do NIC para todos os grupos experimentais, bem como o resultado das comparações intergrupos estão representados na Figura 12. Todos os grupos experimentais apresentaram uma maior perda de inserção quando comparado ao seu respectivo controle ($p < 0,05$). Após o trigésimo dia, observou-se uma tendência de estabilização desta perda.

Para a análise do remanescente ósseo, os resultados acompanharam os já apresentados pela análise 3d. Em que foi observado um remanescente ósseo, significativamente menor, até o vigésimo dia ($p < 0,05$), seguido da estabilização da perda óssea. (Figura 13)

Figura 12 - Medidas do nível clínico de inserção na região interproximal por histologia. * diferença do controle; # diferença do grupo 15 dias.

Figura 13 - Porcentagem de tecido ósseo na bifurcação dos primeiros molares inferiores. * diferença do respectivo controle

4.4 Análise de Expressão Gênica

O padrão da expressão gênica das citocinas foi avaliada e para fins de avaliação dividiu-se em três tempos: 0-7 dias fase aguda pos inserção da ligadura; 8-20 dias período ativo da doença periodontal induzida; 21 a 45 dias de período crônico da doença periodontal induzida.

4.4.1 De 0 a 7 dias - Fase aguda

Na fase aguda após indução por ligadura, as citoquinas MIP1 α , MIP1 β e MCP1 responsáveis pela migração de células tais como neutrófilos e macrófagos, para o local da infecção, apresentaram expressão elevada, especialmente dos dias 1 a 7 após a indução da doença ($p < 0,01$). Ambas, MCP1 e MIP1 α , tiveram uma expressão muito elevada, atingindo valores até 90 vezes mais expressos nestes grupos, que no grupos controles. Associada a estas quimiocinas, houve um aumento da expressão de citocinas relacionadas com a resposta inflamatória inicial, como IL6 e IL1 β , no mesmo período ($p < 0,01$).

Também foi observado um aumento da expressão dos genes relacionados a destruição periodontal, COX2, MMP2, MMP8 e MMP9 ($p < 0,01$). Destacando-se que a MMP8 e MMP9 mostraram níveis de expressão elevados de até 300 vezes mais expressos que o controle ($p < 0,01$).

4.4.2 De 8 a 20 dias – Fase crônica à fase avançada

Durante a transição da fase crônica à fase avançada houve uma grande expressão de IL6, MCP1, MIP1 α , IL1 β e RANKL, citocinas relacionadas com osteoclastogenesis. Observa-se também a expressão da metaloproteinase, MMP8, associada ao período onde ocorre destruição periodontal.

No entanto, a resposta imune do hospedeiro começa a tentar modular essa inflamação, através da expressão de citocinas anti-inflamatórias. O TGF β , IL4 e IL10 mostraram aumento da expressão em comparação com os grupos controles ($p < 0,05$). Mas, sem sobreposição das citocinas pró inflamatórias que caracterizam este período como o de maior perda óssea.

4.4.3 De 21 a 45 dias - Remissão Molecular em fase adiantada de destruição crônica

Após o período ativo de doença, observa-se uma estabilização de perda óssea. Este período é explicado pela diminuição da expressão de citocinas pró inflamatórias e aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias, há um aumento da expressão de IL4, IL10 e TGF β em comparação com os grupos controles ($p < 0,05$). Neste período, as citocinas anti-inflamatórias ultrapassam a expressão das pró inflamatórias, que explica a estabilização de perda óssea, mesmo na presença da ligadura.

4.5 Análise da correlação entre a expressão de MMP, FOXP3 e RANKL com a expressão de citocinas em tecidos periodontais doentes

Utilizou-se análise de regressão linear para investigar as possíveis correlações entre os níveis de expressão das MMPs, FOXP3 e RANKL. MMP8 está correlacionada com IL1 β , TNF α , IL17, MIP1a e MIP1b. MIP1a também está correlacionada com MMP2. RANKL está correlacionada com IL1 β , IL17, IL-6, e MIP1b MIP1a. Sugerindo que estes potenciais mediadores de destruição do tecido são induzidas por citocinas inflamatórias do tipo Th1 e Th17. Correlações positivas foram também encontradas com FOXP3 e IL4 e IFN- γ , sugerindo um possível papel destas citocinas, que modulam a destruição durante o curso da doença periodontal experimental.

Figura 14 – Expressão gênica das MMP's durante o curso da doença periodontal induzida.

Figura 15 – Expressão gênica da quimiocinas durante o curso da doença periodontal induzida.

Figura 16 - Expressão gênica das interleucinas durante o curso da doença periodontal induzida.

Figura 17 - Expressão gênica dos mediadores inflamatórios durante o curso da doença periodontal induzida.

Tabela 2: Correlações entre os níveis de mRNA para MMPs, RANKL e FOXP3 e mRNA das citocinas durante o curso da doença periodontal induzida.

	IL1B	TNF-a	IL17	IL6	MIP1a	MIP1b	IL4	INF-y
MMP2					0,522			
					9,919 ± 3,355			
MMP8	0,6702 0,03193 ± 0,1173	0,4852 0,001662 ± 0,01907	0,9406 0,02909 ± 0,04408	0,4821 0,6870 ± 8,177	0,5404 0,2025 ± 0,06601	0,5425 0,07493 ± 0,02433		
RANKL	0,6213 0,6234 ± 0,1147		0,8849 0,3080 ± 0,03927	0,3996 35,03 ± 15,18	0,6220 1,886 ± 0,5197	0,4527 0,5942 ± 0,2310		
FOXP3							0,7368 0,6842 ± 0,1446	0,4727 0,04350 ± 0,01621

Figura 18 - Correlações das citocinas utilizando genemania.org. Linhas roxas representam co-expressão, as linhas vermelhas representam interação física e as linhas azuis as vias de interação baseadas em pathwaycommons-nci_nature and wu-stein-2010.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Devido às dificuldades em se estabelecer relações causais entre os vários fatores e a destruição, com os estudos em humano de doença periodontal, existe a necessidade de modelos mais controlados de avaliação da doença. Assim, os estudos em animais ainda são necessários para comprovar estas relações de causa e efeito, bem como, testar o potencial de novas terapias. Entretanto, existem, ainda hoje, limitações na escolha do modelo adequado e mais representativo para todos os aspectos da doença periodontal.

O modelo da indução de doença periodontal por ligadura, deriva de modelos de estudos em vários tipos de animais. A colocação da ligadura, na região inter-proximal, leva a um acúmulo de placa e ulceração do epitélio juncional, facilitando a invasão bacteriana no tecido conjuntivo (Rovin et al., 1966). Em ratos, a perda de inserção e óssea ocorre de forma previsível, a partir do sétimo dia (Bezerra et al., 2000, Bezerra et al., 2002, Lohinai et al., 1998). Apesar da ação física da interposição de um fio de seda no espaço interproximal, o modelo de ligadura é dependente da presença de bactérias, assim como em humanos (Kenworthy and Baverel, 1981, Weiner et al., 1979). Além disto, o modelo de indução por ligadura assemelha-se, em outro aspecto, com a doença periodontal de humanos. Sua fase de progressão esta associada com a exacerbação da resposta imune do hospedeiro. Fator comprovado por diversos estudos em que a diminuição desta resposta inflamatória, por diversos mecanismos, entre eles, o uso de endotoxinas e inibidores da COX1 e 2, acarretou em uma menor perda óssea (Bezerra et al., 2000, Kenworthy and Baverel, 1981). Assim, a utilização deste método para avaliação da doença periodontal e sua progressão é reforçada por este mimetizar os dois mecanismos principais da patogenia da doença periodontal.

Durante algum tempo, acreditou-se que a o método de indução por ligadura, estava associado com um aspecto mais agudo da doença periodontal, principalmente, pelo curto tempo de duração dos estudos e a rápida progresso da perda óssea (Graves et al., 2008, Karimbux et al., 1998). O método de gavagem bacteriana oral, que consiste na inoculação de bactérias reconhecidas como periodontopatógenos, principalmente Pg e Fn, - tem sido associado e preconizado para a avaliação em modelos de periodontite crônica (Holt et al., 1988, Polak et al., 2009, de Molon et al., 2015, de Molon et al., 2014, Yuan et al., 2011). Recentemente, um estudo avaliou a longo prazo, 45 e 60 dias, diversos mecanismos de indução da doença periodontal em camundongos, concluindo que a perda óssea alveolar induzida ligadura oferece um modelo confiável, sitio específico, com invaginação epitelial, infiltração de células inflamatórias, e reabsorção do osso alveolar dependente do tempo, e

ainda mais, que o acúmulo de placa estimulado pela ligadura ao redor do fio, estimula e ativa a resposta do hospedeiro, aumentando a quantidade de células inflamatórias na área, levando ao colapso periodontal e, mesmo em períodos de longo prazo, pós infecção, permitindo a análise das respostas locais e sistêmicas durante periodontite experimental (de Molon et al., 2015).

De fato, estudos anteriores apresentaram resultados semelhantes, utilizando modelos de indução da doença periodontal por ligaduras, em roedores (Saadi-Thiers et al., 2013, Bezerra et al., 2002, Liu et al., 2010). As medidas histométricas e de μ CT revelaram um aumento na distância da CEJ para o ABC que indica o aumento da perda óssea. Por outro lado, os nossos dados mostraram um decréscimo na distância da CEJ a ABC após o período de 30 dias, sem a significância estatística. Fato este também observado quando levado em consideração a área e o volume ósseo. Dois estudos anteriores que mostraram maior perda óssea, nos períodos iniciais, após a colocação da ligadura (7 a 30 dias), com a estabilização da reabsorção óssea ao longo do tempo, que corroboram nossos achados até mesmo em tempo experimental prolongado (45 e 60 dias) (de Molon et al., 2014, de Molon et al., 2015).

Uma possível explicação para a redução da perda óssea periodontal, induzida por ligaduras, ao longo do tempo, baseia-se em estudos anteriores (Garcia de Aquino et al., 2009, de Aquino et al., 2009). Estes demonstraram que, como resultado da destruição do osso alveolar, os tecidos periodontais tendem a migrar para uma posição apical numa tentativa de recuperação o espaço biológico, e com isto o efeito da ligadura seria diminuído junto com a gravidade da doença periodontal (de Aquino et al., 2009).

Os resultados histológicos e da micro ct são explicados, no nosso estudo, através do acompanhamento, em longo prazo, da dinâmica da expressão gênica das citocinas. Os dados de expressão de genes apresentados aqui acompanham estudos anteriores. Durante a fase aguda, é possível encontrar uma grande expressão de citocinas relacionadas com a doença periodontal, como: CCL2 (MCP1), CCL3 (MP1-A) e CCL4, especialmente nos primeiros dias, após a inserção da ligadura. Garlet et al, constatou que CCL3 e CCL4 foi expressa dentro de 24 horas após a infecção com lipopolissacarídeo do *A. actinomycetemcomitans* (Garlet et al., 2006). O mesmo grupo descobriu que o CCL3 continua altamente expresso até 15 dias de infecção. Embora, em nossos resultados a CCL3 mostrou uma pequena diminuição, após 5 dias, seu estudo não avaliou este período de tempo (Repeke et al., 2010). Observou-se também uma maior expressão de citocinas do tipo Th1 como IL6, IL1 β que podem ser sustentados pela expressão de CCL3 e CCL4. Isto pode explicar o elevado número de PMN na fase inicial da doença. Isso, juntamente com a expressão da metaloproteinases MMP8 e

MMP9, as quais foram positivamente correlacionadas com a expressão de TNF α e IL1 β , ajuda a explicar a degradação dos tecidos durante a fase ativa da doença periodontais induzida.

IL-1 e TNF- α estimulam a formação de células semelhantes a osteoclastos *in vitro* (Devlin et al., 1998) IL-1 estimula a osteoclastogênese e reabsorção óssea, em grande parte, através de aumento da regulação do ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B (RANKL), enquanto TNF- α pode estimular osteoclastogênese, direta ou indiretamente, por meio do RANKL (Wei et al., 2005, Jin et al., 2007). O papel do ligante RANK foi examinado em um modelo de periodontite induzida por ligadura (Jin et al., 2007). Neste estudo, os ratos foram administrados por via subcutânea, com uma proteína de fusão de OPG-Fc para bloquear o RANKL. Por μ CT e análise histomorfométrica, foram observados reduziada osteoclastogênese e preservação significativa de volume ósseo alveolar, entre os ratos tratados com OPG-Fc, em comparação com os controles.

Durante o curso da infecção, consistentemente são detectados, nos tecidos periodontais dos ratos, citocinas relacionadas ao tipo Th1 de resposta pró-inflamatória: TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL1 β . As citocinas do tipo Th1 tem um papel direto na indução do ativador do receptor do ligando B fator nuclear (RANKL), que induz, diretamente, a diferenciação de células progenitoras em osteoclastos e osteoclastos maduros. Investigando o papel das citocinas pró-inflamatórias, os investigadores examinaram camundongos com eliminação genética de IL-6 e IFN- γ . A introdução de *P. gingivalis* aos camundongos knockout para IFN- γ et IL-6 estimulou perda óssea periodontal menor em comparação com animais controle, indicando que estas citocinas contribuem para a progressão da doença periodontal. Embora, o IFN- γ iniba, diretamente, osteoclastogênese, os resultados sugerem que o efeito estimulador de IFN- γ em monócitos e linfócitos, anula o efeito inibitório direto nos osteoclastos e contribui para a perda óssea induzida por *P. gingivalis* (Yang et al., 2002, Gao et al., 2007). Em outros estudos, demonstrou-se que o IFN- γ foi necessário na prevenção da disseminação sistêmica de uma infecção periodontal, e que a ausência de IFN- γ reduziu os níveis de citocinas inflamatórias e o recrutamento de leucócitos para o periodonto, apoiando o papel de IFN- γ como contribuindo para perda óssea periodontal induzida por bactérias (Garlet et al., 2008).

Interessantemente, IL-4, uma citocina fundamental na indução de respostas de Th2 (Fukada et al., 2009, Garlet et al., 2004), foi detectada até 10 dias, talvez como uma resposta auto-protetora para a expressão mais elevada de citocinas do tipo Th1. Este resultado contraria estudos anteriores, mas eles justificam que a IL-4 pode ser de difícil identificação,

possivelmente, devido à curta meia-vida e à sua instabilidade de mRNA (Katagiri and Takahashi, 2002, Garlet et al., 2004).

Apesar de alguns dados contraditórios sobre o papel das citocinas Th1 e Th2 na doença periodontal, eles têm sido associados, respectivamente, com a ativação e a supressão da atividade da doença. O desenvolvimento de tais padrões sequenciais de expressão de citocinas foi previamente relatada em resposta à inoculação de LPS nos tecidos periodontais de camundongos, embora a sua relevância para a migração de células e para a gravidade da doença não foi estabelecida. Seguindo o curso da DP em ratos, durante a fase crônica para avançada, os nossos resultados mostraram uma diminuição na expressão de mediadores Th1, seguida por um aumento de citocinas de tipo Th2. As citocinas anti-inflamatórias de IL-4 e IL-10 estão associadas com a supressão da reabsorção óssea. A presença de citocinas do tipo Th2 na lesão pode aumentar a resposta imune humoral, que por sua vez, pode contribuir para o controle da doença periodontal. Estes achados sugerem que o padrão de resposta imune poderia determinar a natureza estável ou progressiva da lesão. Corroborando com estudos anteriores (Garlet et al., 2004, Gemmell and Seymour, 2004), em que observamos que uma expressão predominante de citocinas do tipo Th2 e IL-10 estava associada com periodontite crônica, ao passo que, a expressão de quimiocinas do tipo Th1 e IFN- γ predominaram na fase ativa da periodontite. Além disso, a partir de 20 dias, após a infecção, foi detectada a expressão de mRNA de IL-10, uma citocina anti-inflamatória envolvida em respostas Th2. A produção de IL-10 por estas células inibe a expressão de RANKL por células T periféricas, humanas, ativadas no sangue *in vitro*. Além disso, o aumento das concentrações de IL-10 no tecido gengival está associado com concentrações decrescentes de RANKL solúvel (Kawashima and Stashenko, 1999). Indo juntamente com os nossos resultados, em que, após 20 dias de indução, existe uma diminuição de RANKL e um aumento da expressão de IL-10, IL-4 e TGF- β que segue o período onde ocorre uma diminuição da reabsorção óssea.

Adicionalmente, quando analisamos as correlações entre as citocinas, existiram correlações positivas na expressão de IL1 β , TNF α , IL17, MCP1, MIP1a e MIP1b com MMP8, MMP2 e RANKL, sugerindo que tais citocinas inflamatórias e do tipo Th1 desempenham um papel prejudicial na patogênese de doenças periodontais. Em consonância com os nossos dados, estudos anteriores demonstraram claramente que a IL-1 e TNF- α desencadearam eventos deletérios, que ocorrem na doença periodontal, incluindo a estimulação da produção de metaloproteinase de matriz e a reabsorção do osso (Garlet et al., 2006, Graves et al., 2011, Graves and Cochran, 2003, Teitelbaum, 2000). Entretanto, tais estudos não examinaram correlações entre a IL-17. As investigações sobre o papel das

respostas Th17 em modelos de periodontite apresentam resultados conflitantes. Camundongos deficientes em IL-17RA mostram aumento da perda de massa óssea após a infecção oral com *P. gingivalis*. Neste modelo, o recrutamento de neutrófilos dependentes da IL-17, no tecido gengival infectado, era imperativo para a defesa contra a infecção bacteriana. Assim, os camundongos IL-17RA-deficientes mostram um recrutamento reduzido de neutrófilos para sua gengiva inflamada e um aumento da perda de osso (Yu et al., 2007). Inversamente, camundongos deficientes para a proteína Del-1- revelaram um papel para a IL-17 na promoção da destruição óssea. Interleucina-17 inibe a expressão de Del-1, promovendo assim recrutamento de neutrófilos; e, nesta configuração, o recrutamento de neutrófilos parece ser mais destrutivo do que protetor (Eskani et al., 2012). E ainda, estudos, através de ELISA, de microscopia confocal e detecção de RNA, apontam a fonte celular primária de RANKL células T do tipo Th1 e Th17 (Kawai et al., 2006, Hernandez et al., 2006, Han et al., 2013). Corroborando com a associação encontrada da IL-17 com outros fatores relacionados à destruição periodontal neste estudo e em estudos associados a outras doenças crônicas.

Também foi possível perceber correlações entre FOXP3 e IL4 e IFN- γ . Sugerindo que estas citocinas de tipo Th2 e Treg modulam a sua expressão no decurso da doença periodontal experimental. Células T regulatórias positivas para Foxp3 exibem funções de proteção contra a reabsorção óssea patogênica, através de suas propriedades anti-inflamatórias. Células Treg funcionam regulando as respostas Th1 e Th2, através da expressão de IL-10 e TGF- β (Sakaguchi, 2005). Juntamente com a expressão da IL-4, citocina relacionada com a resposta Th2, pode explicar o momento, após o vigésimo dia, em que foi observado uma estabilização da perda óssea induzida por ligadura.

Parece que as citocinas interagem e funcionam dentro de redes biológicas, mas nós ainda não as entendemos completamente, ou como estas redes se relacionam. Uma propriedade importante de tais redes é que as mudanças nos níveis de elementos individuais podem não ter efeitos previsíveis sobre a função, de fato, pode haver novas propriedades emergentes, não aparentes pela investigação dos elementos individuais. Embora seja reconhecido, há muito tempo, que as citocinas são um exemplo de um rede biológica, temos conhecimento muito limitado de como as redes de citoquina podem funcionar na doença humana (Preshaw and Taylor, 2011, Seymour and Taylor, 2004).

Nossa compreensão da patogênese periodontal tem evoluído ao longo dos anos, e continuará a evoluir à medida que a investigação se estende com estudos recentes sobre a patogênese periodontal. Claramente, embora modelos animais podem oferecer uma plataforma para explorar e formação de hipóteses, pode ser difícil extrapolar esses resultados

para doenças humanas. Mas, este é um dos primeiros estudos que incidem sobre a rede de expressão citocinas, em conjunto com um acompanhamento de vários pontos de tempo à longo prazo. Ajudando a caracterizar a totalidade da resposta inflamatória, suas consequências e contribuições na patogênese da doença periodontal.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A periodontite experimental por ligadura, em um período de 45 dias, passa por períodos de exacerbação e remissão.

Nos períodos iniciais observou-se expressão de genes pro-inflamatórios relacionados com a destruição tecidual como: CCL2, CCL3, CCL4, IL1B, IL6, MMP8, MMP9. Apresentando-se correlacionados entre si.

Nos momentos tardios uma maior expressão de genes anti-inflamatórios como IL4 e IL10.

Este processo dinâmico pode ser monitorado por meio de marcadores moleculares e morfométricos e contribuir para uma melhor compreensão da patogenia da doença, contribuir para determinar qual o melhor tempo para avaliar cada biomarcador no processo biológico.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*, 43(11), 5721-5732.
- Abe, M., Kawamoto, K., Okamoto, H., & Horiuchi, N. (2001). Induction of collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8) gene expression by interleukin-1beta in human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*, 36(3), 153-159.
- Assuma, R., Oates, T., Cochran, D., Amar, S., & Graves, D. T. (1998). IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol*, 160(1), 403-409.
- Baker, P. J., Dixon, M., & Roopenian, D. C. (2000). Genetic control of susceptibility to Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss in mice. *Infect Immun*, 68(10), 5864-5868.
- Baker, P. J., Evans, R. T., & Roopenian, D. C. (1994). Oral infection with Porphyromonas gingivalis and induced alveolar bone loss in immunocompetent and severe combined immunodeficient mice. *Arch Oral Biol*, 39(12), 1035-1040.
- Berglundh, T., & Donati, M. (2005). Aspects of adaptive host response in periodontitis. *J Clin Periodontol*, 32 Suppl 6, 87-107.
- Bezerra, M. M., Brito, G. A., Ribeiro, R. A., & Rocha, F. A. (2002). Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Braz J Med Biol Res*, 35(5), 613-616.
- Bezerra, M. M., de Lima, V., Alencar, V. B., Vieira, I. B., Brito, G. A., Ribeiro, R. A., & Rocha, F. A. (2000). Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*, 71(6), 1009-1014.
- Birkedal-Hansen, H. (1993). Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res*, 28(6 Pt 2), 500-510.
- Chang, K. M., Ramamurthy, N. S., McNamara, T. F., Genco, R. J., & Golub, L. M. (1988). Infection with a gram-negative organism stimulates gingival collagenase production in non-diabetic and diabetic germfree rats. *J Periodontal Res*, 23(4), 239-244.
- Colotta, F., Borre, A., Wang, J. M., Tattanelli, M., Maddalena, F., Polentarutti, N., Mantovani, A. (1992). Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes. *J Immunol*, 148(3), 760-765.

- Craig, R. G., Yip, J. K., So, M. K., Boylan, R. J., Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2003). Relationship of destructive periodontal disease to the acute-phase response. *J Periodontol*, 74(7), 1007-1016.
- de Aquino, S. G., Guimaraes, M. R., Stach-Machado, D. R., da Silva, J. A., Spolidorio, L. C., & Rossa, C., Jr. (2009). Differential regulation of MMP-13 expression in two models of experimentally induced periodontal disease in rats. *Arch Oral Biol*, 54(7), 609-617.
- de Molon, R. S., de Avila, E. D., Boas Nogueira, A. V., Chaves de Souza, J. A., Avila-Campos, M. J., de Andrade, C. R., & Cirelli, J. A. (2014). Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *J Periodontol*, 85(3), 465-477.
- de Molon, R. S., Mascarenhas, V. I., de Avila, E. D., Finoti, L. S., Toffoli, G. B., Spolidorio, D. M., Cirelli, J. A. (2015). Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice. *Clin Oral Investig*.
- Delima, A. J., Oates, T., Assuma, R., Schwartz, Z., Cochran, D., Amar, S., & Graves, D. T. (2001). Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol*, 28(3), 233-240.
- Devlin, R. D., Reddy, S. V., Savino, R., Ciliberto, G., & Roodman, G. D. (1998). IL-6 mediates the effects of IL-1 or TNF, but not PTHrP or 1,25(OH)2D3, on osteoclast-like cell formation in normal human bone marrow cultures. *J Bone Miner Res*, 13(3), 393-399.
- Eskandari, M. A., Jotwani, R., Abe, T., Chmelar, J., Lim, J. H., Liang, S., Hajishengallis, G. (2012). The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. *Nat Immunol*, 13(5), 465-473.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 4(4), 330-336.
- Fukada, S. Y., Silva, T. A., Garlet, G. P., Rosa, A. L., da Silva, J. S., & Cunha, F. Q. (2009). Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiol Immunol*, 24(1), 25-31.
- Gao, Y., Grassi, F., Ryan, M. R., Terauchi, M., Page, K., Yang, X., Pacifici, R. (2007). IFN-gamma stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. *J Clin Invest*, 117(1), 122-132.

- Garcia de Aquino, S., Manzolli Leite, F. R., Stach-Machado, D. R., Francisco da Silva, J. A., Spolidorio, L. C., & Rossa, C., Jr. (2009). Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. *Life Sci*, 84(21-22), 745-754.
- Garlet, G. P., Cardoso, C. R., Campanelli, A. P., Ferreira, B. R., Avila-Campos, M. J., Cunha, F. Q., & Silva, J. S. (2007). The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clin Exp Immunol*, 147(1), 128-138.
- Garlet, G. P., Cardoso, C. R., Campanelli, A. P., Garlet, T. P., Avila-Campos, M. J., Cunha, F. Q., & Silva, J. S. (2008). The essential role of IFN-gamma in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *Microbes Infect*, 10(5), 489-496.
- Garlet, G. P., Cardoso, C. R., Silva, T. A., Ferreira, B. R., Avila-Campos, M. J., Cunha, F. Q., & Silva, J. S. (2006). 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*, 21(1), 12-20.
- Garlet, G. P., Martins, W., Jr., Fonseca, B. A., Ferreira, B. R., & Silva, J. S. (2004). Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 31(8), 671-679.
- Gemmell, E., & Seymour, G. J. (2004). Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000*, 35, 21-41.
- Graves, D. (2008). Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, 79(8 Suppl), 1585-1591.
- Graves, D. T. (1999). The potential role of chemokines and inflammatory cytokines in periodontal disease progression. *Clin Infect Dis*, 28(3), 482-490.
- Graves, D. T., & Cochran, D. (2003). The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, 74(3), 391-401.
- Graves, D. T., Fine, D., Teng, Y. T., Van Dyke, T. E., & Hajishengallis, G. (2008). The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, 35(2), 89-105.
- Graves, D. T., Li, J., & Cochran, D. L. (2011). Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res*, 90(2), 143-153.

- Grossi, S. G., Genco, R. J., Machtei, E. E., Ho, A. W., Koch, G., Dunford, R., Hausmann, E. (1995). Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol*, 66(1), 23-29.
- Gupta, M., Chaturvedi, R., & Jain, A. (2013). Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) as an immune-diagnostic biomarker in the pathogenesis of chronic periodontal disease. *Cytokine*, 61(3), 892-897.
- Gyorfi, A., Fazekas, A., Suba, Z., Ender, F., & Rosivall, L. (1994). Neurogenic component in ligature-induced periodontitis in the rat. *J Clin Periodontol*, 21(9), 601-605.
- Haffajee, A. D., & Socransky, S. S. (2005). Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol 2000*, 38, 9-12.
- Hajishengallis, G., Lamont, R. J., & Graves, D. T. (2015). The enduring importance of animal models in understanding periodontal disease. *Virulence*, 6(3), 229-235.
- Han, X., Lin, X., Yu, X., Lin, J., Kawai, T., LaRosa, K. B., & Taubman, M. A. (2013). Porphyromonas gingivalis infection-associated periodontal bone resorption is dependent on receptor activator of NF-kappaB ligand. *Infect Immun*, 81(5), 1502-1509.
- Hardham, J., Reed, M., Wong, J., King, K., Laurinat, B., Sfintescu, C., & Evans, R. T. (2005). Evaluation of a monovalent companion animal periodontal disease vaccine in an experimental mouse periodontitis model. *Vaccine*, 23(24), 3148-3156.
- Hart, G. T., Shaffer, D. J., Akilesh, S., Brown, A. C., Moran, L., Roopenian, D. C., & Baker, P. J. (2004). Quantitative gene expression profiling implicates genes for susceptibility and resistance to alveolar bone loss. *Infect Immun*, 72(8), 4471-4479.
- Hernandez, M., Valenzuela, M. A., Lopez-Otin, C., Alvarez, J., Lopez, J. M., Vernal, R., & Gamonal, J. (2006). Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *J Periodontol*, 77(11), 1863-1870.
- Holt, S. C., Ebersole, J., Felton, J., Brunsvold, M., & Kornman, K. S. (1988). Implantation of Bacteroides gingivalis in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. *Science*, 239(4835), 55-57.
- Horton, J. E., Raisz, L. G., Simmons, H. A., Oppenheim, J. J., & Mergenhagen, S. E. (1972). Bone resorbing activity in supernatant fluid from cultured human peripheral blood leukocytes. *Science*, 177(4051), 793-795.
- Hughes, F. J. (1995). Cytokines and cell signalling in the periodontium. *Oral Dis*, 1(4), 259-265.

- Jin, Q., Cirelli, J. A., Park, C. H., Sugai, J. V., Taba, M., Jr., Kostenuik, P. J., & Giannobile, W. V. (2007). RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. *J Periodontol*, 78(7), 1300-1308.
- Jordan, H. V., & Keyes, P. H. (1964). Aerobic, Gram-Positive, Filamentous Bacteria as Etiologic Agents of Experimental Periodontal Disease in Hamsters. *Arch Oral Biol*, 9, 401-414.
- Josefowicz, S. Z., & Rudensky, A. (2009). Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity*, 30(5), 616-625.
- Karimbux, N. Y., Ramamurthy, N. S., Golub, L. M., & Nishimura, I. (1998). The expression of collagen I and XII mRNAs in Porphyromonas gingivalis-induced periodontitis in rats: the effect of doxycycline and chemically modified tetracycline. *J Periodontol*, 69(1), 34-40.
- Katagiri, T., & Takahashi, N. (2002). Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis*, 8(3), 147-159.
- Kawai, T., Matsuyama, T., Hosokawa, Y., Makihiro, S., Seki, M., Karimbux, N. Y., Taubman, M. A. (2006). B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol*, 169(3), 987-998.
- Kawashima, N., & Stashenko, P. (1999). Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol*, 44(1), 55-66.
- Kenworthy, R., & Baverel, M. (1981). Studies of a periodontal tissue lesion in the rat, untreated or treated with chlorhexidine digluconate. *J Clin Periodontol*, 8(4), 349-358.
- Klausen, B. (1991). Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol*, 62(1), 59-73.
- Kubota, T., Nomura, T., Takahashi, T., & Hara, K. (1996). Expression of mRNA for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontitis-affected human gingival tissue. *Arch Oral Biol*, 41(3), 253-262.
- Liacini, A., Sylvester, J., Li, W. Q., & Zafarullah, M. (2005). Mithramycin downregulates proinflammatory cytokine-induced matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther*, 7(4), R777-783.
- Lindhe, J., Hamp, S. E., & Loe, H. (1975). Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. A 4-year clinical, roentgenographical and histometrical study. *J Periodontal Res*, 10(5), 243-255.

- Liu, Y. F., Wu, L. A., Wang, J., Wen, L. Y., & Wang, X. J. (2010). Micro-computerized tomography analysis of alveolar bone loss in ligature- and nicotine-induced experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res*, 45(6), 714-719.
- Loe, H. (1967). The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol*, 38(6), Suppl:610-616.
- Loe, H., Theilade, E., Jensen, S. B., & Schiott, C. R. (1967). Experimental gingivitis in man. 3. Influence of antibiotics on gingival plaque development. *J Periodontal Res*, 2(4), 282-289.
- Lohinai, Z., Benedek, P., Feher, E., Gyorfi, A., Rosivall, L., Fazekas, A., Szabo, C. (1998). Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. *Br J Pharmacol*, 123(3), 353-360.
- Makela, M., Salo, T., Uitto, V. J., & Larjava, H. (1994). Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J Dent Res*, 73(8), 1397-1406.
- Meyle, J., & Chapple, I. (2015). Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000*, 69(1), 7-17.
- Polak, D., Wilensky, A., Shapira, L., Halabi, A., Goldstein, D., Weiss, E. I., & Hourri-Haddad, Y. (2009). Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/*Fusobacterium nucleatum* infection: bone loss and host response. *J Clin Periodontol*, 36(5), 406-410.
- Preshaw, P. M., & Taylor, J. J. (2011). How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol*, 38 Suppl 11, 60-84.
- Repeke, C. E., Ferreira, S. B., Jr., Claudino, M., Silveira, E. M., de Assis, G. F., Avila-Campos, M. J., Garlet, G. P. (2010). Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and its receptors CCR1+ and CCR5+ in RANKL+ cell migration throughout experimental periodontitis in mice. *Bone*, 46(4), 1122-1130.
- Roberts, F. A., & Darveau, R. P. (2015). Microbial protection and virulence in periodontal tissue as a function of polymicrobial communities: symbiosis and dysbiosis. *Periodontol 2000*, 69(1), 18-27.
- Rossi, D., & Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*, 18, 217-242.

- Rovin, S., Costich, E. R., & Gordon, H. A. (1966). The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *J Periodontal Res*, 1(3), 193-204.
- Saadi-Thiers, K., Huck, O., Simonis, P., Tilly, P., Fabre, J. E., Tenenbaum, H., & Davideau, J. L. (2013). Periodontal and systemic responses in various mice models of experimental periodontitis: respective roles of inflammation duration and *Porphyromonas gingivalis* infection. *J Periodontol*, 84(3), 396-406.
- Sakaguchi, S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*, 6(4), 345-352.
- Sakaki, H., Matsumiya, T., Kusumi, A., Imaizumi, T., Satoh, H., Yoshida, H., Kimura, H. (2004). Interleukin-1beta induces matrix metalloproteinase-1 expression in cultured human gingival fibroblasts: role of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2. *Oral Dis*, 10(2), 87-93.
- Sallusto, F., & Baggiolini, M. (2008). Chemokines and leukocyte traffic. *Nat Immunol*, 9(9), 949-952.
- Samejima, Y., Ebisu, S., & Okada, H. (1990). Effect of infection with *Eikenella corrodens* on the progression of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res*, 25(5), 308-315.
- Saxe, S. R., Greene, J. C., Bohannon, H. M., & Vermillion, J. R. (1967). Oral debris, calculus, and periodontal disease in the beagle dog. *Periodontics*, 5(5), 217-225.
- Seymour, G. J., & Taylor, J. J. (2004). Shouts and whispers: An introduction to immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol 2000*, 35, 9-13.
- Sharma, A., Inagaki, S., Honma, K., Sfintescu, C., Baker, P. J., & Evans, R. T. (2005). *Tannerella forsythia*-induced alveolar bone loss in mice involves leucine-rich-repeat BspA protein. *J Dent Res*, 84(5), 462-467.
- Sorsa, T., Mantyla, P., Ronka, H., Kallio, P., Kallis, G. B., Lundqvist, C., Tikanoja, S. (1999). Scientific basis of a matrix metalloproteinase-8 specific chair-side test for monitoring periodontal and peri-implant health and disease. *Ann N Y Acad Sci*, 878, 130-140.
- Taddei, S. R., Queiroz-Junior, C. M., Moura, A. P., Andrade, I., Jr., Garlet, G. P., Proudfoot, A. E., da Silva, T. A. (2013). The effect of CCL3 and CCR1 in bone remodeling induced by mechanical loading during orthodontic tooth movement in mice. *Bone*, 52(1), 259-267.

- Teitelbaum, S. L. (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science*, 289(5484), 1504-1508.
- Tonetti, M. S., Freiburghaus, K., Lang, N. P., & Bickel, M. (1993). Detection of interleukin-8 and matrix metalloproteinases transcripts in healthy and diseased gingival biopsies by RNA/PCR. *J Periodontal Res*, 28(6 Pt 2), 511-513.
- Van Dyke, T. E., & Serhan, C. N. (2003). Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res*, 82(2), 82-90.
- Wei, S., Kitaura, H., Zhou, P., Ross, F. P., & Teitelbaum, S. L. (2005). IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest*, 115(2), 282-290.
- Weiner, G. S., DeMarco, T. J., & Bissada, N. F. (1979). Long term effect of systemic tetracycline administration on the severity of induced periodontitis in the rat. *J Periodontol*, 50(12), 619-623.
- Wilensky, A., Gabet, Y., Yumoto, H., Hourri-Haddad, Y., & Shapira, L. (2005). Three-dimensional quantification of alveolar bone loss in *Porphyromonas gingivalis*-infected mice using micro-computed tomography. *J Periodontol*, 76(8), 1282-1286.
- Woessner, J. F., Jr., & Gunja-Smith, Z. (1991). Role of metalloproteinases in human osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl*, 27, 99-101.
- Yang, S., Madyastha, P., Ries, W., & Key, L. L. (2002). Characterization of interferon gamma receptors on osteoclasts: effect of interferon gamma on osteoclastic superoxide generation. *J Cell Biochem*, 84(3), 645-654.
- Yu, J. J., Ruddy, M. J., Wong, G. C., Sfintescu, C., Baker, P. J., Smith, J. B., Gaffen, S. L. (2007). 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*, 109(9), 3794-3802.
- Yu, X., Antoniades, H. N., & Graves, D. T. (1993). Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human inflamed gingival tissues. *Infect Immun*, 61(11), 4622-4628.
- Yu, X., Huang, Y., Collin-Osdoby, P., & Osdoby, P. (2004). CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 19(12), 2065-2077.
- Yuan, H., Gupte, R., Zelkha, S., & Amar, S. (2011). Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand antagonists inhibit tissue inflammation and bone loss in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol*, 38(11), 1029-1036.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo A – Certificados de aprovação do comitê de ética no uso de animais

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o Protocolo nº 2013.1.1197.58.9 sobre a pesquisa intitulada **"Resposta Imune da infecção periodontal induzida por patógenos e comensais"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Mário Taba Junior, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, foi APROVADO em reunião da CEUA de 19/02/2014 (totalizando 15 animais).

We certify that the protocol nº 2013.1.1197.58.9 about the research entitled **"Immune response of periodontal infection induced by pathogenic and commensal microbiota"**, under responsibility of Prof. Dr. Mário Taba Junior, is in accordance with the Ethical principles in animal research adopted by the Animal Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil was approved in 19/02/2014 (totalizing 15 animals).

Ribeirão Preto, 20 de fevereiro de 2014.

Profa. Dra. Andriara De Rossi Daldegan
Coordenadora da CEUA – FORP/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o Protocolo nº 2013.1.709.58.6 sobre a pesquisa intitulada “Dinâmica da resposta inflamatória em modelo animal de doença periodontal”, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Mário Taba Júnior, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, foi APROVADO em reunião da CEUA de 28/08/2013 (totalizando 30 animais).

We certify that the protocol nº 2013.1.709.58.6 about the research entitled “Dynamics of the inflammatory response in animal models of periodontal disease”, under responsibility of Prof. Dr. Mário Taba Júnior, is in accordance with the Ethical principles in animal research adopted by the Ethical Commission for Animals Use of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil was approved in 28/08/2013 (totalizing 30 animals).

Ribeirão Preto, 28 de agosto de 2013.

Prof. Dra. Andara De Rossi Daldegan
Coordenadora da CEUA – FORP/USP

Anexo B - Artigo científico submetido para publicação no Journal of Periodontal Research

Dynamics of Host Response in Ligature Induced Periodontitis

Gustavo Henrique Apolinário Vieira **,

Viviane Casagrande Mariguela *

Patricia Garani Fernandes *,

Daniela Bazan Palioto *,

Sérgio Luís Scombatti de Souza *,

Michel Reis Messoria *,

Arthur Belém Novaes Jr*,

Mario Taba Jr *

Corresponding author: Mario Taba, Jr. Department of Oral Surgery and Periodontology, University of São Paulo - Ribeirão Preto School of Dentistry, Avenida do Café - s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil; e-mail: mtaba@usp.br

Key words: Periodontitis, Gene expression

Words: 3217 ; **Figures:** 3; **Tables:** 2; **References:** 31

Conflict of Interest and Source of Funding: The authors declare that they have no conflicts of interest in this study. We appreciate the financial support given by FAPESP.

Abstract

Background: Periodontitis is a multifactorial disease initiated by the presence of bacterial biofilms that interacts with the defense mechanisms of the host and causes intense inflammatory response and tissue destruction. Evidence suggests that periodontal disease has dynamic states of exacerbation and remission.

Methods: Fifty rats received ligation in 1 molar and were sacrificed at the following times: 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30 and 45 days, 5 rats per time evaluation. Mandibles samples, and gingival biopsies were use for microtomography and gene expression analysis..

Results: Histological results showed microtomographyc and progressive bone loss and inflammation to the influx time of 20 days ($p < 0.05$). After this time it was observed stabilization of bone loss. In the initial periods observed expression of pro-inflammatory genes associated with tissue destruction as CCL2, CCL3, CCL4, IL1B, IL6, MMP8, MMP9 and late times greater expression of anti-inflammatory genes such as IL4 and IL10. Linear regression analysis was used to investigate the possible correlation between levels of MMP expression, FOXP3 and RANKL. MMP8 is correlated with IL1 β , TNFa, IL17, MCP1, MIP1a and MIP1b. MIP1a is also correlated with MMP2. RANKL is correlated with IL1 β , IL17, IL-6, and MIP1b MIP1a. Positive correlations were also found with FOXP3 and IL4 and IFN- γ ,

Conclusion: Experimental periodontitis, in a period of 45 days, passes through periods of exacerbation and remission. This dynamic process can be monitored by molecular and morphometric markers and contribute to a better understanding of the pathogenesis of the disease, helping to determine the best time to evaluate each biomarker, or biological process.

INTRODUCTION

Periodontitis is a multifactorial disease initiated by the presence of bacterial biofilm that interacts with host response(Loe et al., 1967, Socransky, 1977) and causes an intense inflammation and tissue destruction that can lead to tooth loss(Meyle and Chapple, 2015).

Studies have suggested that the production of pro- and anti-inflammatory cytokines in periodontal tissues is an important factor for determining the course and / or severity of the disease(Silva et al., 2007, Hajishengallis and Lambris, 2010). A balanced immune response against the bacterial biofilm is critical in maintaining a healthy periodontium, without causing tissue damage(Meyle and Chapple, 2015). Otherwise, a persistent inflammatory response triggered by pathogenic biofilms leads to the destruction of the periodontal soft tissues and bones, with consequent loss of teeth(Van Dyke and Serhan, 2003).

It is well known that periodontal diseases are initiated by bacteria, but there is still controversy about which bacteria actually initiate the events that led to the irreversible collapse of periodontal tissues(Pihlstrom et al., 2005). Moreover, there is evidence that these bacteria are only indirectly important periodontal pathogens. It is recognized that the host response plays a major role in periodontal tissue degradation and both innate and acquired immunity are likely involved(Assuma et al., 1998). Showing a dynamic state of remission and exacerbation, which may be described in terms of progression and regression of the disease patterns(Goodson et al., 1982).

The involvement of the host immune response in periodontal disease has been identified with the help of conceptual advances in this field. The host immune responses in periodontal disease involves both innate and adptative elements and feedbacks(Hajishengallis, 2015).

Given the difficulties and limitations of human studies on periodontal disease in establishing causal relationships between the various factors and periodontal destruction. Animal models are necessary to prove the relationship of cause and effect and to test potential new therapies(Hajishengallis et al., 2015).

So the aim of this study is to evaluate in an animal model of periodontal disease the role of the host immune response during the period of onset of periodontal disease.

MATERIALS AND METHODS

1. Animals selections

Wistar Kyoto male rats males, with approximately 10 - 12 weeks old, from the vivarium of the Department of Neurology at Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP) were used. All procedures were performed in accordance with ethical standards governed by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and the study was approved by the Ethics Committee in the use of Animals (CEUA) Campus of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil (protocol No 10.1.379.53.2).

2. Groups division

With the objective of evaluate events of progression of periodontal disease mice were divided into ten groups (n = 5) by the sacrifice time after induction of periodontal disease and a control group. (Table 1)

3. Experimental Periodontal Disease Induction with Ligature

For ligature placement in L groups, animals were anesthetized by intraperitoneal injection with Xylazine[†] solution at 2% (2 mg / ml) and Ketamine[‡] 10% (10 mg / mL) in the doses of 10 mg / kg (Xylazine) and 80 mg / kg (ketamine).

After general anesthesia, animals of Groups L were placed on the operating table, which allowed the rats' mouths to be kept open, facilitating access to posterior teeth of the mandible. A cotton[§] ligature was placed around the right mandibular first molar of each animal. Periodically, the body weight and the presence of ligatures were monitored in animals. If the ligature loss was observed, a new animal was prepared for study.

4. Euthanasia and collection of material for analysis

The animals were euthanized under anesthesia with final solution of 2% Xylazine¹ hydrochloride (2 mg / mL) and 10% Ketamine² (10 mg / mL), in respective doses of 30 mg / kg and 240 mg / kg, according to the time of sacrifice for each subgroup.

The mandibles of all animals used in the study were treat as follows:
The right hemi-mandibles had their gingival tissue removed for performing gene expression analysis. The left hemi-mandibles, whose gingival tissue was not removed, were subjected to microtomography analyzes.

¹ Rompun®, Bayer Animal Health

² Dopalen - Agribands - Brazil Ltda

5. Computed microtomography-μCT

After sacrificing the animals, the left mandibles were removed (N = 5 for each group), fixed in 10% formalin for 24 hours and then were transferred to a solution of 70% and stored at room temperature. The specimens were scanned using computed microtomography system³.

Linear analysis (2D): To perform linear analysis was used a two-dimensional software⁴ to allow visualization and quantification of bone loss in a computer. All scanned cuts were reoriented in three planes, front, coronal and transaxial before each analysis to align the anatomical position. The extent of alveolar bone loss was determined (in mm) from the cementum-enamel junction (CEJ) to the alveolar crest (COA) in the distal region of the distal-palatal root of the first molar and the mesial region of the palatine of the second root molar. The images in the frontal sections were reoriented so that both the CEJ as the root apex appeared in the same court tomographic standardized so all images.

Volumetric analysis (3D): Volumetric measurements were made using a specific software⁵, following the selection of an area of interest (ROI - region of interest) three-dimensional. The elected area was the furcation region of the mandibular first molar. To maximize the quantification of bone, minimize the inclusion of teeth and roots and use the least possible markings, the ROI was defined in the mesial-distal direction from the distal of the first molar root to the mesial root of the first molar, and in a cervix-apical direction encompassing the entire roof of the furcation of the first molar to the total disappearance of the mesial root of the first molar apically. Thus, all the bone area of the first molar furcation region was involved in ROI. This region was chosen because it is more consistent between the specimens and the fact that the placement of the ligature and the injections were made in this area. Using a powerful tool for ROI drawing, 2D contour was drawn at regular intervals (every 12 planes) to minimize the effect of the variability of the root contour. Then a 3D ROI was created using a software⁶ based on the resulting 2D contour. From there, the bone volume fraction parameters were determined. A blinded and calibrated examiner performed analyses.

³ Skyscan 1174, Aartselaar, Belgium

⁴ Data Viewer 1.4.3.1 - SkyScan, Belgium

⁵ CT Analyser 1.10.1.0 - SkyScan, Belgium

⁶ CT Analyser 1.10.1.0 - SkyScan, Belgium

6. Biopsy Protocol:

The gingiva was removed from the bucal and lingual 1^os molar region of the right hemi-mandible of each animal. Specimens of approximately 2 mm x 2 mm of tissue were obtained and thoroughly washed with sterile saline stored at -80 for later subjected to total RNA extraction and gene expression analysis

7. Analysis of gene expression:

RNA was isolated from biopsies by extraction kit SV Total RNA Isolation System⁷ according to manufacturer's protocol, including treatment with DNase to remove any residual genomic DNA. One microgram of total RNA isolated was reverse transcribed to cDNA with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit⁸ containing random hexamers according to the manufacturer's protocol.

The analysis of gene expression of inflammatory genes: IL1 β , TNFa, TGFb, IL12, IL17, MCP1, MIP1 α , MIP1 β , COX2, MMP2, MMP8, MMP9, IL10, IL6, IFNa, FOXP3 and RANKL were performed by Real-time RT- Genex PCR using TaqMan Assay⁹. For this, each cDNA was amplified using β -actin constitutive gene as reference gene for normalization. Amplification was performed in the thermal cycler StepOnePlus¹⁰ for 40 cycles according to the manufacturer's protocol. Fluorescence was collected for each amplification cycle and analyzed by 2- $\Delta\Delta$ Ct method to quantify the relative.

8. Statistical Analyses

Animals were considered the study unit. The sample size was determined to Provide 80% power to recognize the Significant Difference between groups of 20% and the standard deviation of 15% with a 95% confidence interval ($\alpha = 0.05$)

The microtomography data were grouped by groups and presented as mean and standard deviation. Linear regression analysis was used to test possible correlations between the levels of expression of MMPs, FOXP3 and RANKL compared to levels of cytokines expression. Differences at each time point were assessed using analysis of variance (ANOVA). Significant levels were set at 95% ($p < 0.05$) and all calculations were performed using Statistical for Windows.¹¹

⁷ Promega, USA

⁸ Applied Biosystems, USA

⁹ Applied Biosystems, USA

¹⁰ Applied Biosystems, USA

¹¹ StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA

RESULTS

The rats were kept and treated according to the guidelines of the local Ethics Committee for Animal Care and Use (Protocol 2013.1.709.58.6) following all the recommendations of the Animal Research: in vivo reports (ARRIVE) guidelines for the implementation and presentation in animal studies. Having each experimental group $n = 5$.

Micro tomography analysis

The results of linear measurements were extracted from an image a single two-dimensional slice chosen for being the most representative to detect bone loss. The parameters evaluated to measure POA (bone loss) were: a) Furcation- away from the roof of the furcation to interradicular bone crest of the M1, b) Vestibular - distance from JCE (cementum-enamel junction) to the crestal bone buccal = JCE-VOC c) lingual - distance from CEJ to bone crest lingual = JCE-COL.

Figure 1 shows the mean values of linear bone loss in furcation, buccal and lingual. With all experimental groups presented statistically significant differences as compared to their respective controls ($p < 0.05$).

Three-dimensional analysis

Through analysis of 3d every region of furcation (CEJ to the total disappearance of the root) taking into account the bone volume parameter (BV), all experimental groups showed statistically lower remaining bone when compared to the control group. (Figure 2) the induced periodontal disease by ligature progressed again, until the thirtieth day a reduction of standard progression after this period.

Analysis of Gene Expression

The pattern of gene expression of cytokines was evaluated and divided in three times according to the following times: 0-7 days acute phase the post ligation; 7-30 days active period of the induced periodontal disease; 30 to 45 days of chronic period induced periodontal disease. (Figure 3)

From 0 to 7 days – Acute phase

In response to ligature at the acute phase, cytokines MIP1 α , MIP1 β and MCP1 responsible for cell migration, such as neutrophils and macrophages, to the site of infection showed high expression especially on days 1 and 7 after disease induction ($p < 0.01$). Both MCP1 as MIP1 α had a very high expression, reaching 90 times more expressed in these groups than in the control group. Associated with an increased

expression of cytokines related of initial inflammatory response, IL6 and IL1 β , in the same period ($p < 0.01$).

It was also observed the increased expression ($P < 0.01$) genes related periodontal destruction, COX2, MMP2, MMP8 and MMP9. EMPHASIZING is that the MMP8 and MMP9 cytokines showed high expression levels reaching 300 times more expressed the control (MMP8) ($p < 0.01$).

From 7 to 20 days – Chronic to Advanced Phase

During the chronic to advanced phase there was a great expression of IL6, MCP1, MIP1 α , IL1 β and RANKL. Cytokines related to osteoclastogenesis. It is also observed MMP8 expression representing the period in which occurs the most prevalent form of periodontal destruction.

However the host immune response starts trying to modulate this inflammation through the expression of anti-inflammatory cytokines. The TGF β , IL4 and IL10 showed increased expression compared to the control group ($p < 0.05$). But without overlapping pro inflammatory cytokines characterizing this period as the most bone loss.

From 20 to 45 days – Molecular Remission in Advanced Phase of Chronic Destruction

After the active period of disease is observed a stabilization of bone loss. This period is explained by the decreased expression of pro inflammatory cytokines and increased expression of anti inflammatory cytokines, there is an increased expression of IL4, IL10 and TGF β compared to the control group ($p < 0.05$). In this period the anti-inflammatory cytokines ultraprassam the expression of pro inflammatory, explaining the stabilization of bone loss even in precensa ligature.

Correlation analysis of the expression of MMPs, FOXP3 and RANKL with expression of cytokines in diseased periodontal tissues

We used linear regression analysis to investigate the possible correlations between the levels of expression of MMPs, FOXP3 and RANKL. MMP8 is correlated to IL1 β , TNF α , IL17, MCP1, MIP1a and MIP1b. MIP1a is also correlated to MMP2. RANKL is correlated to IL1 β , IL17, IL6, MIP1b and MIP1a. Suggesting these potential mediators of tissue destruction are induced by inflammatory and Th1-type cytokines. Positive correlation was also found with FOXP3 and IL4 and IFN- γ , suggesting a possible role of these cytokines modulating the destruction during the course of experimental periodontal disease. (Table 2)

DISCUSSION

Ligature induction of periodontal disease has been associated to more acute models of disease (Hajishengallis et al., 2015). Recently it has been postulated that it can be used to mimic more chronic features of the disease (de Molon et al., 2015). Justifying its use at this current study to verify the dynamic expression in a long term analysis.

The gene expression data presented here goes along with previous studies (Garlet et al., 2005, Garlet et al., 2003). During the acute phase we could find a high expression of cytokines related to periodontal diseases as CCL2 (MCP1), CCL3 (MIP1-A) and CCL4, specially at the early days. Garlet et al. found that CCL3 and CCL4 was expressed within 24h after infection of A.a LPS (Garlet et al., 2005). The same group found that CCL3 continuously highly express until 15 days of infection (Repeke et al., 2010). Although in our results CCL3 showed a little decrease after 5 days, their study didn't look for that timepoint. It was also observed a higher expression of Th1-type cytokines as IL6, IL1 β that can be sustained by the CCL3 and CCL4 expression (Schrum et al., 1996). This together explain the high number of macrophages in the initial phase of the disease. Additionally, the chemoattraction of IFN γ producing Th1 cells, classically involved in the activation of macrophages (Ma et al., 2003). That along with the expression of the metalloproteinases MMP8,-9 which were positively correlated to the expression of TNF α and IL1 β , helps to explain the tissue breakdown during the active phase of induced periodontal diseases.

During the course of the infection we consistently detected in periodontal tissues of mice messages for the pro-inflammatory and Th1-type cytokines TNF- α , IFN- γ , IL6 and IL1 β (Campbell et al., 2015). The Th1-type cytokines has a direct role in the induction of receptor activator of nuclear factor B ligand (RANKL), which directly induces differentiation of osteoclast progenitor cells into mature osteoclasts. Interestingly, IL-4, a key cytokine in the induction of Th2 responses (Fukada et al., 2009), was detected until day 10, maybe as a self-protective response to the higher expression of Th1-type cytokine. This result goes against previous studies but they justify that IL-4 could not be identified because is difficult to be detected possibly due to the short-half life and instability of its mRNA (Garlet et al., 2005, Ukai et al., 2001).

In spite of some conflicting data on the role of Th1 and Th2 cytokines in PD, they have been associated, respectively, with activation and suppression of disease activity (Meyle and Chapple, 2015). The development of such sequential patterns of

cytokine expression was previously reported in response to inoculation of LPS in periodontal tissues of mice (Iwasaki et al., 1998), although their relevance to cell migration and to the severity of disease outcome was not established. Following the course of PD in mice, during the chronic to advanced phase, our results showed a decrease in the expression of Th1 mediators followed by an increase of Th2-type cytokines. The anti-inflammatory cytokines IL-4, IL-10 and IL-13, are associated with suppression of bone reabsorption. The Th2-type cytokines in the lesion may enhance the humoral immune response, which in turn may contribute to the control of periodontopathogens in the gingival crevice and in periodontal tissues. These findings suggest that the pattern of immune response could determine the stable or progressive nature of the lesion. In agreement, in previous studies (Garlet et al., 2005, Garlet et al., 2003) we found that a predominant expression of Th2-type chemokine and IL-10 was associated with chronic periodontitis, while the expression of Th1-type chemokines and IFN- γ predominated in active phase of periodontitis. In addition, starting at 20 days post infection, we detected the expression of IL-10 mRNA, an anti-inflammatory cytokine involved in Th2 responses. Treg cells function to down-regulate Th1 and Th2 immune responses through their expression of IL-10 and TGF- β (Sakaguchi, 2005). The production of IL-10 by these cells has been found to inhibit RANKL expression by activated human peripheral blood T cells in vitro. Moreover, increasing concentrations of IL-10 in gingival tissue is associated with decreasing concentrations of soluble RANKL (Ernst et al., 2007). Going along with our results, in which after 20 days of induction there is a decrease of RANKL and an increase of IL-10, IL-4 and TGF- β expression that follows the stopped of bone reabsorption.

Additionally, when we analyze the correlations between cytokines, there were positive correlations in the expression of IL1 β , TNF α , IL17, MCP1, MIP1a and MIP1b with MMP8, MMP2 and RANKL, suggesting that such inflammatory and Th1 cytokines play a detrimental role in the pathogenesis of periodontal diseases. Going according to our data, previous studies have shown that IL-1 and TNF- α clearly trigger deleterious events that occur in periodontal disease, including stimulation of matrix metalloproteinase production and bone reabsorption (Garlet et al., 2005, Graves et al., 2011). However those studies did not examine correlations between IL-17. Investigations into the role of Th17 responses in periodontitis models show conflicting results. Deficient mice in IL-17RA show increased bone loss after oral

infection with *P. gingivalis*. In this model, the recruitment of neutrophils dependent of IL-17 on the infected gingival tissue was imperative for the defense against bacterial infection. Thus IL-17RA-deficient mice show a reduced recruitment of neutrophils into inflamed gingiva and their increased bone loss (Yu et al., 2007). Conversely, mice deficient for Del-1 protein revealed a role for IL-17 in promoting bone destruction. Interleukin-17 inhibits the expression of Del-1, thereby promoting the recruitment of neutrophils; and in this configuration the recruitment of neutrophils appears to be more destructive than protective (Eskan et al., 2012). And further study by ELISA, and RNA confocal detection to the point source of RANKL primary cell type T cell Th1 and Th17 microscopy (Kawai et al., 2006, Han et al., 2013). Corroborating the association of IL-17 with other factors related to periodontal destruction in this study and study associated with other chronic diseases.

It was also possible to see correlations between FOXP3 and IL4 and IFN- γ . Suggesting that these Th2 and Treg type cytokines modulating expression in the course of experimental periodontal disease. Positive regulatory T cells to Foxp3 exhibit protective functions against pathogenic bone reabsorption through their anti-inflammatory properties. Treg cell function regulating Th1 and Th2 responses through the expression of IL-10 and TGF- β (Campbell et al., 2015). Together with the expression of IL-4, cytokine related to the Th2 response may explain the time after the twentieth day where a stabilization of the bone loss induced by ligature was observed.

It seems that cytokines interact and function within networks, but we do not yet understand the networks, or how the balance of the networks relate (Preshaw and Taylor, 2011). An important property of such networks is that changes in the levels of individual elements may not have predictable effects on function, indeed there may be new emergent properties not apparent by the investigation of individual elements (Gardy et al., 2009). Although it has long been recognized that cytokines are one example of a biological network (Seymour and Taylor, 2004), we have very limited understanding of how cytokine networks might function in human disease. Clearly, although animal models offer a platform for exploring and forming hypotheses, it can be difficult to extrapolate such findings to human disease. But this is one of the first studies that focus on the network of cytokines expression together with various time points in a long term follow up. Helping to characterize the totality of the cytokine response, the consequences for the host immune response, and what contribution this makes to

disease pathogenesis.

CONCLUSION

Experimental periodontitis, in a period of 45 days, passes through periods of exacerbation and remission. This dynamic process can be monitored by molecular and morphometric markers and contribute to a better understanding of the pathogenesis of the disease, helping to determine the best time to evaluate each biomarker, or biological process.

REFERENCE:

- (1) Loe H, Theilade E, Jensen SB, Schiott CR. Experimental gingivitis in man. 3. Influence of antibiotics on gingival plaque development. *J Periodontal Res* 1967; **2**: 282-289.
- (2) Socransky SS. Microbiology of periodontal disease -- present status and future considerations. *J Periodontol* 1977; **48**: 497-504.
- (3) Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000 2015; **69**: 7-17.
- (4) Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res* 2007; **86**: 306-319.
- (5) Hajishengallis G, Lambris JD. Crosstalk pathways between Toll-like receptors and the complement system. *Trends in immunology* 2010; **31**: 154-163.
- (6) Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res* 2003; **82**: 82-90.
- (7) Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet* 2005; **366**: 1809-1820.
- (8) Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* 1998; **160**: 403-409.
- (9) Goodson JM, Tanner AC, Haffajee AD, Sornberger GC, Socransky SS. Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1982; **9**: 472-481.
- (10) Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol* 2015; **15**: 30-44.
- (11) Hajishengallis G, Lamont RJ, Graves DT. The enduring importance of animal models in understanding periodontal disease. *Virulence* 2015; **6**: 229-235.
- (12) de Molon RS, Mascarenhas VI, de Avila ED, et al. Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice. *Clin Oral Investig* 2015.
- (13) Garlet GP, Avila-Campos MJ, Milanezi CM, Ferreira BR, Silva JS. Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2005; **7**: 738-747.
- (14) Garlet GP, Martins W, Jr., Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res* 2003; **38**: 210-217.
- (15) Repeke CE, Ferreira SB, Jr., Claudino M, et al. Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and its receptors CCR1+ and CCR5+ in RANKL+ cell migration throughout experimental periodontitis in mice. *Bone* 2010; **46**: 1122-1130.

- (16) Schrum S, Probst P, Fleischer B, Zipfel PF. Synthesis of the CC-chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, and RANTES is associated with a type 1 immune response. *J Immunol* 1996; **157**: 3598-3604.
- (17) Ma J, Chen T, Mandelin J, et al. Regulation of macrophage activation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2003; **60**: 2334-2346.
- (18) Campbell L, Millhouse E, Malcolm J, Culshaw S. T cells, teeth and tissue destruction - what do T cells do in periodontal disease? *Molecular oral microbiology* 2015.
- (19) Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, da Silva JS, Cunha FQ. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral microbiology and immunology* 2009; **24**: 25-31.
- (20) Ukai T, Mori Y, Onoyama M, Hara Y. Immunohistological study of interferon-gamma- and interleukin-4-bearing cells in human periodontitis gingiva. *Arch Oral Biol* 2001; **46**: 901-908.
- (21) Iwasaki Y, Hara Y, Koji T, Shibata Y, Nakane PK, Kato I. Differential expression of IFN-gamma, IL-4, IL-10, and IL-1beta mRNAs in decalcified tissue sections of mouse lipopolysaccharide-induced periodontitis mandibles assessed by in situ hybridization. *Histochemistry and cell biology* 1998; **109**: 339-347.
- (22) Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology* 2005; **6**: 345-352.
- (23) Ernst CW, Lee JE, Nakanishi T, et al. Diminished forkhead box P3/CD25 double-positive T regulatory cells are associated with the increased nuclear factor-kappaB ligand (RANKL+) T cells in bone resorption lesion of periodontal disease. *Clinical and experimental immunology* 2007; **148**: 271-280.
- (24) Graves DT, Li J, Cochran DL. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res* 2011; **90**: 143-153.
- (25) Yu JJ, Ruddy MJ, Wong GC, 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**: 3794-3802.
- (26) Eskin MA, Jotwani R, Abe T, et al. The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. *Nature immunology* 2012; **13**: 465-473.
- (27) Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *The American journal of pathology* 2006; **169**: 987-998.
- (28) Han X, Lin X, Yu X, et al. Porphyromonas gingivalis infection-associated periodontal bone resorption is dependent on receptor activator of NF-kappaB ligand. *Infect Immun* 2013; **81**: 1502-1509.
- (29) Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol* 2011; **38 Suppl 11**: 60-84.
- (30) Gardy JL, Lynn DJ, Brinkman FS, Hancock RE. Enabling a systems biology approach to immunology: focus on innate immunity. *Trends in immunology* 2009; **30**: 249-262.
- (31) Seymour GJ, Taylor JJ. Shouts and whispers: An introduction to immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol 2000* 2004; **35**: 9-13.

FIGURE LEGENDS:

Figure 1- Means and standard deviations of linear measurements with micro ct. A – Buccal; B – Lingual; C – Furcation. * indicate significant differences between groups (ANOVA, Tukey, P <0.05).

Figure 2 - Means and standard deviations of BV (A) BV/ TV (B), as well as

intergroup comparisons. * indicate significant differences between groups (ANOVA, Tukey, $P < 0.05$). BV = bone volume; TV= tissue volume.

Figure 3 - Kinetics of cytokine production in the course of experimental periodontal disease. The levels of mRNA were quantified by Real-time RT-PCR utilizing TaqMan GenEx Assay, as described in Material and methods. A - MMP's; B – Chemokines; C – Interleukins; D – Inflammatory mediators

TABLE 1: Group division.

<i>Control Group – no ligature (n =5)</i>
<i>Group L-1: one day after the induction of periodontal disease (n = 5);</i>
<i>Group L-3: three days after the induction of periodontal disease (n=5);</i>
<i>Group L-5: five days after the induction of periodontal disease (n=5);</i>
<i>Group L-7: seven days after the induction of periodontal disease (n=5);</i>
<i>Group L-10: ten days after the induction of periodontal disease (n=5);</i>
<i>Group L-15: fifteen days after the induction of periodontal disease (n=5);</i>
<i>Group L-20: twenty days after the induction of periodontal disease (n=5);</i>
<i>Group L-30: thirty days after the induction of periodontal disease (n=5);</i>
<i>Group L-45: forty-five days after the induction of periodontal disease (n=5);</i>

Figure 1

Figure 2

Figure 3:

ANEXO C - Artigo científico submetido para publicação no Journal Archives of Oral Biology

Long term evaluation of ligature induced periodontitis by histomorfometry, histopathologic and micro ct analizys

Gustavo Henrique Apolinário Vieira ^{i*},

Patricia Garani Fernandes ^{*},

Luiz Fernando Ferreira de Oliveira^{*},

Daniela Bazan Palioto ^{*},

Sérgio Luís Scombatti de Souza ^{*},

Michel Reis Messoria ^{*},

Arthur Belém Novaes Jr^{*},

Mario Taba Jr ^{*}

Corresponding author: Mario Taba, Jr. Department of Oral Surgery and Periodontology, University of São Paulo - Ribeirão Preto School of Dentistry, Avenida do Café - s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil; e-mail: mtaba@usp.br

Key words: Periodontitis, Animal models, Micro ct

Words: 2546 ; **Figures:** 3; **Tables:** 1; **References:** 25

Conflict of Interest and Source of Funding: The authors declare that they have no conflicts of interest in this study. We appreciate the financial support given by FAPESP.

Abstract

Background: Traditionally, animal models of experimental PD have been used to evaluate the periodontitis pathogenesis, to investigate the host–bacteria interactions, and to test new treatment modalities. Methods for measuring alveolar bone loss in animal studies of periodontitis, including histologic, morphometric, and radiographic methods, have been established. the aim of this study is to characterize the pattern of progression in a ligature model of induction using histomorphometry, and micro-CT.

Methods: Fifty rats received ligature at 1st molar and were sacrificed at the following times: 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30 and 45 days, 5 rats per time of evaluation. Histomorphometry, micro-CT and histopathologic analyzis were performed.

Results: Histological and micro tomographic results showed progressive bone loss and inflammation to the time of 20 days ($p < 0.05$). After this time it was observed stabilization of bone loss and inflammation.

Conclusion: Ligature model generate a durable framework, based on prolonged bone loss, for dissecting the mechanistic basis of periodontitis even at long term proved by various methods of analysis. And still one of the easiest models to induce periodontitis at animal basis and reliable to use even in long-term basis.

INTRODUCTION

A pathogenic biofilm is a necessary prerequisite for periodontitis (PD) to develop but in it is insufficient to cause the disease (Meyle and Chapple, 2015). Disease results from complex interactions between the biofilm and the inflammatory immune response (Hajishengallis, 2015). Mechanisms of host response in the periodontal tissues are complex and involve numerous systems of interactions. (Preshaw and Taylor, 2011, Graves et al., 2011)

Traditionally, animal models of experimental PD have been used to evaluate the periodontitis pathogenesis, to investigate the host–bacteria interactions, and to test new treatment modalities (Kesavalu et al., 2007, Graves et al., 2012, Graves et al., 2008, de Molon et al., 2015). Rodents and humans share characteristics of PD such as anatomy, bacterial colonization, and susceptibility to experimentally induced PD. Mice are especially important because they provide powerful genetic tools and allow modifications of their genome, enabling the study of specific molecules or cells, to test mechanistic hypotheses in the development and progression of PD (Hajishengallis et al., 2015).

In mouse models, tissue inflammation followed by periodontal breakdown is induced mainly by two different methods: (i) placement of ligature around the cervical area of maxillary or mandibular molar teeth, and (ii) oral gavage model (Graves et al., 2012). In the first method, the ligature acts as a niche to bacterial colonization, inducing a large accumulation of plaque and leading to epithelial migration and tissue destruction, similar to those observed in human periodontitis (Graves et al., 2008). The oral gavage model has been used in an attempt to reproduce the alveolar bone resorption observed during chronic human PD. Being ligature is considered an acute model of induction (Rovin et al., 1966, Duarte et al., 2010).

Methods for measuring alveolar bone loss in animal studies of periodontitis, including histologic, morphometric, and radiographic methods, have been well established (Klausen et al., 1989). Linear measurements are commonly used to detect bone loss in these methods (Amstad-Jossi and Schroeder, 1978, Klausen et al., 1989). To achieve three-dimensional evaluation of alveolar bone loss in periodontitis animal models, microcomputed tomography (micro-CT) has been used in recent studies (Naito et al., 1998).

So it is important to better characterize these models, to determine the disease progression as well as the histologic and radiographic features, searching for

the best model for studying human. Therefore the aim of this study is to characterize the pattern of progression in a ligature model of induction using histomorphometry, and micro-CT.

MATERIALS AND METHODS

Animals selections

Wistar Kyoto male rats males, with approximately 10 - 12 weeks old, from the vivarium of the Department of Neurology at Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP) were used. All procedures were performed in accordance with ethical standards governed by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and the study was approved by the Ethics Committee in the use of Animals (CEUA) Campus of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil (protocol No 10.1.379.53.2).

Groups division

With the objective of evaluate events of progression of periodontal disease mice were divided into ten groups (n = 5) by the sacrifice time after induction of periodontal disease and their respective controls. (Table 1)

Experimental Periodontal Disease Induction with Ligature

For ligature placement in L groups, animals were anesthetized by intraperitoneal injection with Xylazine[†] solution at 2% (2 mg / ml) and Ketamine[‡] 10% (10 mg / mL) in the doses of 10 mg / kg (Xylazine) and 80 mg / kg (ketamine).

After general anesthesia, animals of Groups L were placed on the operating table, which allowed the rats' mouths to be kept open, facilitating access to posterior teeth of the mandible. A cotton[§] ligature was placed around the right mandibular first molar of each animal. Periodically, the body weight and the presence of ligatures were monitored in animals. If the ligature loss was observed, a new animal was prepared for study.

Euthanasia and collection of material for analysis

The animals were euthanized under anesthesia with final solution of 2% Xylazine¹² hydrochloride (2 mg / mL) and 10% Ketamine¹³ (10 mg / mL), in respective doses of 30 mg / kg and 240 mg / kg, according to the time of sacrifice for each subgroup.

¹² Rompun®, Bayer Animal Health

¹³ Dopalen - Agribands - Brazil Ltda

The mandibles of all animals used in the study were treated as follows: right hemi-mandibles had their gingival tissue removed for performing gene expression analysis. The left hemi-mandibles, whose gingival tissue was not removed, were subjected to histometric and histochemical analyzes

Computed microtomography- μ CT

After sacrificing the animals, the left mandibles were removed (N = 5 for each group), fixed in 10% formalin for 24 hours and then were transferred to a solution of 70% and stored at room temperature. The specimens were scanned using computed microtomography system¹⁴.

Linear analysis (2D): To perform linear analysis was used a two-dimensional software¹⁵ to allow visualization and quantification of bone loss in a computer. All scanned cuts were reoriented in three planes, front, coronal and transaxial before each analysis to align the anatomical position, ie, mesial-distal, vestibular-palatal and medial and lateral. The extent of alveolar bone loss was determined (in mm) from the cementum-enamel junction (CEJ) to the alveolar crest (ABC) in the distal region of the distal-palatal root of the first molar and the mesial region of the palatine of the second root molar (Figure 1). The images in the frontal sections were reoriented so that both the CEJ as the root apex appeared in the same court tomographic standardized so all images.

Volumetric analysis (3D): Volumetric measurements were made using a specific software¹⁶, following the selection of an area of interest (ROI - region of interest) three-dimensional. The elected area was the furcation region of the mandibular first molar. To maximize the quantification of bone, minimize the inclusion of teeth and roots and use the least possible markings, the ROI was defined in the mesial-distal direction from the distal of the first molar root to the mesial root of the first molar, and in a cervix-apical direction encompassing the entire roof of the furcation of the first molar to the total disappearance of the mesial root of the first molar apically. Thus, all the bone area of the first molar furcation region was involved in ROI (Figure 2). This region was chosen because it is more consistent between the specimens and the fact that the placement of the ligature and the injections were made in this area. Using a powerful tool for ROI drawing, 2D contour was drawn at

¹⁴ Skyscan 1174, Aartselaar, Belgium

¹⁵ Data Viewer 1.4.3.1 - SkyScan, Belgium

¹⁶ CT Analyser 1.10.1.0 - SkyScan, Belgium

regular intervals (every 12 planes) to minimize the effect of the variability of the root contour. Then a 3D ROI was created using a software¹⁷ based on the resulting 2D contour. From there, the bone volume fraction parameters were determined. A blinded and calibrated examiner performed analyses.

Histomorphometric analysis

After routine laboratorial processing, two sections representing the most central buccal-lingual portion in the furcation area of left mandibular first molars were selected for histopathological and histometric analyses. Histologic sections were evaluated under light microscopy with an optical microscope. For histometric analysis, photomicrographs were captured by a digital camera connected to a light microscope. The images were analyzed using appropriate software. The attachment loss and bone remaining were measured.

Statistical Analyses

Animals were considered the study unit. The sample size was determined to Provide 80% power to Recognize the Significant Difference between groups of 20% and the standard deviation of 15% with a 95% confidence interval ($\alpha = 0.05$) using the change in the ANBL the primary outcome variable. Therefore, the sample size of 9 animals was required.

The histometric and histochemical data were grouped by groups and presented as mean and standard deviation. Differences at each time point were assessed using analysis of variance (ANOVA). Significant levels were set at 95% ($p < 0.05$) and all calculations were performed using Statistical for Windows.¹⁸

RESULTS

The rats were kept and treated according to the guidelines of the local Ethics Committee for Animal Care and Use (Protocol 2013.1.709.58.6) following all the recommendations of the Animal Research: in vivo reports (ARRIVE) guidelines for the implementation and presentation in animal studies. Having each experimental group $n = 5$.

¹⁷ CT Analyser 1.10.1.0 - SkyScan, Belgium

¹⁸ StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA

Micro tomography analysis

The results of linear measurements were extracted from an image a single two-dimensional slice chosen for being the most representative to detect bone loss. The parameters evaluated to measure POA (bone loss) were: a) Furca - away from the roof of the furcation to interradicular bone crest of the M1, b) Vestibular - distance from JCE (cementum-enamel junction) to the buccal bone crest = JCE- ABC) c) lingual - distance from CEJ to lingual bone crest = JCE-LBC.

Figure 3 shows the mean values of linear bone loss in furcation, buccal and lingual. With all experimental groups presented statistically significant differences as compared to their respective controls ($p < 0.05$).

Three-dimensional analysis

Through analysis of 3d at region of furcation (CEJ to the total disappearance of the root) taking into account the bone volume parameter (BV), all experimental groups showed statistically lower remaining bone when compared to the control group. (Figure 4) The induced periodontal disease by ligature progressed again, until the twentieth day, showing a reduction of standard progression after this period.

Histometric analysis

Means and standard deviations of the NIC for all experimental groups as well as the result of intergroup comparisons. All the experimental groups showed a higher insertion loss when compared to their respective controls ($p < 0.05$). After the twenty day there was a trend of stabilization of this loss. (Figure 5).

For the remaining bone analysis, the results followed the already presented by the analysis 3d. Where it was observed significantly less bone remaining until the twentieth day ($p < 0.05$), followed by stabilization of bone loss.

Histopathological analysis

In all control groups, periodontal ligament (PL) presented a great amount of collagen fibers, fibroblasts, blood vessels and discreet inflammatory infiltrate. Collagen fibers were inserted both in cementum and in alveolar bone. The bone tissue of the furcation region presented a few irregularities on its surface. In all groups, junctional and sulcular epithelia integrities were observed in the interproximal area (Fig 6).

All periodontitis groups presented connective tissue with few fibroblasts, unorganized and detached collagen fibers, interstitial edema and moderate chronic inflammatory infiltrate (Figs. 6). In some areas the connective tissue presented

intense inflammatory infiltrate consisting primarily of neutrophils. The bone of the interradicular septum and the root cement showed irregular outer contours and resorption areas until 20 days (Figs 6). A severe damage of the junctional and sulcular epithelia and apical migration of the junctional epithelia were observed in the interproximal area (Fig.6). The neutrophils infiltrate increase until group 20 days. After that time a less extensive infiltrate was observed. The connective tissue pattern followed the attachment loss and bone remaining results presenting numerous fibroblasts, a little interstitial edema and collagen fibers inserted both in cementum and in alveolar bone.

DISCUSSION

Experimental animal models of PD have been largely utilized to reproduce the clinical, radiographic, and histologic features of human disease. These models allow investigation of cellular and molecular mechanisms as well as mediators involved during the establishment and progression of the PD (Hajishengallis et al., 2015).

Ligature is considered the most reproducible model of PD and is considered an acute model of disease in which bone loss occurs predictably after 7 to 15 days of disease induction (de Aquino et al., 2009). Although ligature is considered an acute model of inflammation, our data demonstrate, by means of stereometric analysis, that the inflammation is increased, compared to group C, even after prolonged period of time, characterized by an increase in the inflammatory cells (mononuclear and polynuclear leukocytes) and vascular structures, with a concomitant decrease in the number of fibroblasts and extracellular matrix.

The efficiency of experimental periodontitis models is almost systematically based on alveolar bone level assessment. Histometric and μ CT measurements revealed an increase in the distance from the CEJ to the ABC that denotes increased bone loss. On the other hand, our data showed a decrease in the CEJ to the ABC distance from 30- to 45-day period, without statistical significance. Two previous studies (de Molon et al., 2015, de Molon et al., 2014) showed increased bone loss in the initial periods after ligature placement (7 to 30 days) with stabilization of bone reabsorption over time, which corroborate our findings even in prolonged experimental time (45 days).

One possible explanation for the decrease of periodontal bone loss over time with ligatures is based on previous studies (de Aquino et al., 2009, Garcia de Aquino

et al., 2009) that showed that as a result of alveolar bone breakdown, periodontal tissues tend to migrate to an apical position in an attempt to recover the biologic space, decreasing the disease severity over time.

However, inflammation was clearly induced in the ligature group, as evidenced by the infiltration of leukocytes, especially PMNs consistent with observations made for ferrets, dogs, rats, monkeys, and humans (Fischer and Klinge, 1994, Schroeder and Lindhe, 1980). Periodontal tissue destruction increased with increasing experimental time and corresponding to obvious inflammatory infiltration. Moreover, the periodontal destruction with bone reabsorption and epithelial downgrowth observed in our model were in agreement with data from studies on monkeys, rodents, dogs, and humans. (Kennedy and Polson, 1973, Rowe and Bradley, 1981)

We also compared histomorphometric, morphometric, and micro-CT methods for charting the progression of periodontitis in this model. We found that all three methods yielded comparable results for detecting alveolar bone loss. Our results are consistent with previous studies showing a significant correlation between micro-CT and histomorphology (von Stechow et al., 2003).

Histologic analysis is an accurate and widely accepted technique in measuring alveolar bone loss. (Irving et al., 1975) Although necessary tissue preparation steps require substantial effort, these types of measurements can simultaneously provide alveolar bone loss quantification and other histology/immunohistochemistry measurements. Morphometric techniques are also widely used in measuring the alveolar bone loss in animal models of periodontitis (Irving et al., 1975). This method is precise in measuring horizontal bone loss and is reproducible (Klausen et al., 1989, Klausen, 1991). A disadvantage is that soft tissues must be removed before measuring. Once that has been performed, however, morphometry provides a quick way to measure alveolar bone loss. Micro-CT is a very sensitive technique to show interproximal bone loss and to provide three-dimensional images. It also provides the adequate possibility to assess bone loss by determining three-dimensional structures of hard tissue using the volumetric method. (Seto et al., 2006, de Molon et al., 2015)

Collectively, this rats model of periodontitis validates, compliments, and enhances published PD models that utilize ligature and supports the importance animal models in dissecting the mechanist aspects of periodontal disease.

CONCLUSION

Since periodontitis is a complex disease, no animal model can fully recapitulate its complexity. Ligature model generate a durable framework, based on bone loss, for dissecting the mechanistic basis of periodontitis even at long term proved by various methods of analysis. And still one of the easiest models to induce periodontitis at animal basis and reliable to use even in long-term basis.

REFERENCE:

- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I. & Dewhirst, F. E. (2005) Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* **43**, 5721-5732. doi:10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005.
- Abe, M., Kawamoto, K., Okamoto, H. & Horiuchi, N. (2001) Induction of collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8) gene expression by interleukin-1beta in human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* **36**, 153-159.
- Amstad-Jossi, M. & Schroeder, H. E. (1978) Age-related alterations of periodontal structures around the cemento-enamel junction and of the gingival connective tissue composition in germ-free rats. *J Periodontal Res* **13**, 76-90.
- Assuma, R., Oates, T., Cochran, D., Amar, S. & Graves, D. T. (1998) IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* **160**, 403-409.
- Baker, P. J., Dixon, M. & Roopenian, D. C. (2000) Genetic control of susceptibility to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in mice. *Infect Immun* **68**, 5864-5868.
- Baker, P. J., Evans, R. T. & Roopenian, D. C. (1994) Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and induced alveolar bone loss in immunocompetent and severe combined immunodeficient mice. *Arch Oral Biol* **39**, 1035-1040.
- Berglundh, T. & Donati, M. (2005) Aspects of adaptive host response in periodontitis. *J Clin Periodontol* **32 Suppl 6**, 87-107. doi:10.1111/j.1600-051X.2005.00820.x.
- Bezerra, M. M., Brito, G. A., Ribeiro, R. A. & Rocha, F. A. (2002) Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Braz J Med Biol Res* **35**, 613-616.
- Bezerra, M. M., de Lima, V., Alencar, V. B., Vieira, I. B., Brito, G. A., Ribeiro, R. A. & Rocha, F. A. (2000) Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* **71**, 1009-1014. doi:10.1902/jop.2000.71.6.1009.
- Birkedal-Hansen, H. (1993) Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res* **28**, 500-510.
- Campbell, L., Millhouse, E., Malcolm, J. & Culshaw, S. (2015) T cells, teeth and tissue destruction - what do T cells do in periodontal disease? *Mol Oral Microbiol*. doi:10.1111/omi.12144.
- Chang, K. M., Ramamurthy, N. S., McNamara, T. F., Genco, R. J. & Golub, L. M. (1988) Infection with a gram-negative organism stimulates gingival collagenase production in non-diabetic and diabetic germfree rats. *J Periodontal Res* **23**, 239-244.
- Colotta, F., Borre, A., Wang, J. M., Tattaneli, M., Maddalena, F., Polentarutti, N., Peri, G. & Mantovani, A. (1992) Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes. *J Immunol* **148**, 760-765.
- Craig, R. G., Yip, J. K., So, M. K., Boylan, R. J., Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2003) Relationship of destructive periodontal disease to the acute-phase response. *J Periodontol* **74**, 1007-1016. doi:10.1902/jop.2003.74.7.1007.

- de Aquino, S. G., Guimaraes, M. R., Stach-Machado, D. R., da Silva, J. A., Spolidorio, L. C. & Rossa, C., Jr. (2009) Differential regulation of MMP-13 expression in two models of experimentally induced periodontal disease in rats. *Arch Oral Biol* **54**, 609-617. doi:10.1016/j.archoralbio.2009.03.007.
- de Molon, R. S., de Avila, E. D., Boas Nogueira, A. V., Chaves de Souza, J. A., Avila-Campos, M. J., de Andrade, C. R. & Cirelli, J. A. (2014) Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *J Periodontol* **85**, 465-477. doi:10.1902/jop.2013.130225.
- de Molon, R. S., Mascarenhas, V. I., de Avila, E. D., Finoti, L. S., Toffoli, G. B., Spolidorio, D. M., Scarel-Caminaga, R. M., Tetradis, S. & Cirelli, J. A. (2016) Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice. *Clin Oral Investig*. doi:10.1007/s00784-015-1607-0.
- de Oliveira, L. F. F. Administração tópica do probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 reduz a destruição tecidual periodontal em ratos com periodontite experimental: estudo histológico, microtomográfico, imunológico e microbiológico. Dissertação de Mestrado-FORP-USP Ribeirao Preto (2016)
- Delima, A. J., Oates, T., Assuma, R., Schwartz, Z., Cochran, D., Amar, S. & Graves, D. T. (2001) Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol* **28**, 233-240.
- Devlin, R. D., Reddy, S. V., Savino, R., Ciliberto, G. & Roodman, G. D. (1998) IL-6 mediates the effects of IL-1 or TNF, but not PTHrP or 1,25(OH)₂D₃, on osteoclast-like cell formation in normal human bone marrow cultures. *J Bone Miner Res* **13**, 393-399. doi:10.1359/jbmr.1998.13.3.393.
- Duarte, P. M., Tezolin, K. R., Figueiredo, L. C., Feres, M. & Bastos, M. F. (2010) Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol* **55**, 142-147. doi:10.1016/j.archoralbio.2009.10.006.
- Dumitrescu, A. L., Abd-El-Aleem, S., Morales-Aza, B. & Donaldson, L. F. (2004) A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. *J Clin Periodontol* **31**, 596-603. doi:10.1111/j.1600-051X.2004.00528.x.
- Ernst, C. W., Lee, J. E., Nakanishi, T., Karimbux, N. Y., Rezende, T. M., Stashenko, P., Seki, M., Taubman, M. A. & Kawai, T. (2007) Diminished forkhead box P3/CD25 double-positive T regulatory cells are associated with the increased nuclear factor-kappaB ligand (RANKL+) T cells in bone resorption lesion of periodontal disease. *Clin Exp Immunol* **148**, 271-280. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03318.x.
- Eskan, M. A., Jotwani, R., Abe, T., Chmelar, J., Lim, J. H., Liang, S., Ciero, P. A., Krauss, J. L., Li, F., Rauner, M., Hofbauer, L. C., Choi, E. Y., Chung, K. J., Hashim, A., Curtis, M. A., Chavakis, T. & Hajishengallis, G. (2012) The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. *Nat Immunol* **13**, 465-473. doi:10.1038/ni.2260.
- Fischer, R. G. & Klinge, B. (1994) Clinical and histological evaluation of ligature-induced periodontitis in the domestic ferret. *J Clin Periodontol* **21**, 230-239.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* **4**, 330-336. doi:10.1038/ni904.
- Fukada, S. Y., Silva, T. A., Garlet, G. P., Rosa, A. L., da Silva, J. S. & Cunha, F. Q. (2009) Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiol Immunol* **24**, 25-31. doi:10.1111/j.1399-302X.2008.00469.x.
- Gao, Y., Grassi, F., Ryan, M. R., Terauchi, M., Page, K., Yang, X., Weitzmann, M. N. & Pacifici, R. (2007) IFN-gamma stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. *J Clin Invest* **117**, 122-132. doi:10.1172/JCI30074.
- Garcia de Aquino, S., Manzolli Leite, F. R., Stach-Machado, D. R., Francisco da Silva, J. A., Spolidorio, L. C. & Rossa, C., Jr. (2009) Signaling pathways associated with the expression of inflammatory

- mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. *Life Sci* **84**, 745-754. doi:10.1016/j.lfs.2009.03.001.
- Gardy, J. L., Lynn, D. J., Brinkman, F. S. & Hancock, R. E. (2009) Enabling a systems biology approach to immunology: focus on innate immunity. *Trends Immunol* **30**, 249-262. doi:10.1016/j.it.2009.03.009.
- Garlet, G. P., Avila-Campos, M. J., Milanezi, C. M., Ferreira, B. R. & Silva, J. S. (2005) Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. *Microbes Infect* **7**, 738-747. doi:10.1016/j.micinf.2005.01.012.
- Garlet, G. P., Cardoso, C. R., Campanelli, A. P., Ferreira, B. R., Avila-Campos, M. J., Cunha, F. Q. & Silva, J. S. (2007) The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clin Exp Immunol* **147**, 128-138. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03260.x.
- Garlet, G. P., Cardoso, C. R., Campanelli, A. P., Garlet, T. P., Avila-Campos, M. J., Cunha, F. Q. & Silva, J. S. (2008) The essential role of IFN-gamma in the control of lethal Aggregatibacter actinomycetemcomitans infection in mice. *Microbes Infect* **10**, 489-496. doi:10.1016/j.micinf.2008.01.010.
- Garlet, G. P., Cardoso, C. R., Silva, T. A., Ferreira, B. R., Avila-Campos, M. J., Cunha, F. Q. & Silva, J. S. (2006) 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* **21**, 12-20. doi:10.1111/j.1399-302X.2005.00245.x.
- Garlet, G. P., Martins, W., Jr., Ferreira, B. R., Milanezi, C. M. & Silva, J. S. (2003) Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontol Res* **38**, 210-217.
- Garlet, G. P., Martins, W., Jr., Fonseca, B. A., Ferreira, B. R. & Silva, J. S. (2004) Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* **31**, 671-679. doi:10.1111/j.1600-051X.2004.00545.x.
- Gemmell, E. & Seymour, G. J. (2004) Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000* **35**, 21-41. doi:10.1111/j.0906-6713.2004.003557.x.
- Goodson, J. M., Tanner, A. C., Haffajee, A. D., Sornberger, G. C. & Socransky, S. S. (1982) Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* **9**, 472-481.
- Graves, D. (2008) Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol* **79**, 1585-1591. doi:10.1902/jop.2008.080183.
- Graves, D. T. (1999) The potential role of chemokines and inflammatory cytokines in periodontal disease progression. *Clin Infect Dis* **28**, 482-490. doi:10.1086/515178.
- Graves, D. T. & Cochran, D. (2003) The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* **74**, 391-401. doi:10.1902/jop.2003.74.3.391.
- Graves, D. T., Fine, D., Teng, Y. T., Van Dyke, T. E. & Hajishengallis, G. (2008) The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol* **35**, 89-105. doi:10.1111/j.1600-051X.2007.01172.x.
- Graves, D. T., Kang, J., Andrianakaja, O., Wada, K. & Rossa, C., Jr. (2012) Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Front Oral Biol* **15**, 117-132. doi:10.1159/000329675.
- Graves, D. T., Li, J. & Cochran, D. L. (2011) Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res* **90**, 143-153. doi:10.1177/0022034510385236.
- Grossi, S. G., Genco, R. J., Machtei, E. E., Ho, A. W., Koch, G., Dunford, R., Zambon, J. J. & Hausmann, E. (1995) Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol* **66**, 23-29.

- Gupta, M., Chaturvedi, R. & Jain, A. (2013) Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) as an immune-diagnostic biomarker in the pathogenesis of chronic periodontal disease. *Cytokine* **61**, 892-897. doi:10.1016/j.cyto.2012.12.012.
- Gyorfi, A., Fazekas, A., Suba, Z., Ender, F. & Rosivall, L. (1994) Neurogenic component in ligature-induced periodontitis in the rat. *J Clin Periodontol* **21**, 601-605.
- Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (2005) Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol 2000* **38**, 9-12. doi:10.1111/j.1600-0757.2005.00112.x.
- Hajishengallis, G. (2015) Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol* **15**, 30-44. doi:10.1038/nri3785.
- Hajishengallis, G. & Lambris, J. D. (2010) Crosstalk pathways between Toll-like receptors and the complement system. *Trends Immunol* **31**, 154-163. doi:10.1016/j.it.2010.01.002.
- Hajishengallis, G., Lamont, R. J. & Graves, D. T. (2015) The enduring importance of animal models in understanding periodontal disease. *Virulence* **6**, 229-235. doi:10.4161/21505594.2014.990806.
- Han, X., Lin, X., Yu, X., Lin, J., Kawai, T., LaRosa, K. B. & Taubman, M. A. (2013) Porphyromonas gingivalis infection-associated periodontal bone resorption is dependent on receptor activator of NF-kappaB ligand. *Infect Immun* **81**, 1502-1509. doi:10.1128/IAI.00043-13.
- Hardham, J., Reed, M., Wong, J., King, K., Laurinat, B., Sfintescu, C. & Evans, R. T. (2005) Evaluation of a monovalent companion animal periodontal disease vaccine in an experimental mouse periodontitis model. *Vaccine* **23**, 3148-3156. doi:10.1016/j.vaccine.2004.12.026.
- Hart, G. T., Shaffer, D. J., Akilesh, S., Brown, A. C., Moran, L., Roopenian, D. C. & Baker, P. J. (2004) Quantitative gene expression profiling implicates genes for susceptibility and resistance to alveolar bone loss. *Infect Immun* **72**, 4471-4479. doi:10.1128/IAI.72.8.4471-4479.2004.
- Hernandez, M., Valenzuela, M. A., Lopez-Otin, C., Alvarez, J., Lopez, J. M., Vernal, R. & Gamonal, J. (2006) Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *J Periodontol* **77**, 1863-1870. doi:10.1902/jop.2006.050461.
- Holt, S. C., Ebersole, J., Felton, J., Brunsvold, M. & Kornman, K. S. (1988) Implantation of Bacteroides gingivalis in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. *Science* **239**, 55-57.
- Horton, J. E., Raisz, L. G., Simmons, H. A., Oppenheim, J. J. & Mergenhagen, S. E. (1972) Bone resorbing activity in supernatant fluid from cultured human peripheral blood leukocytes. *Science* **177**, 793-795.
- Hughes, F. J. (1995) Cytokines and cell signalling in the periodontium. *Oral Dis* **1**, 259-265.
- Irving, J. T., Newman, M. G., Socransky, S. S. & Heely, J. D. (1975) Histological changes in experimental periodontal disease in rats mono-infected with a gram-negative organism. *Arch Oral Biol* **20**, 219-220.
- Iwasaki, Y., Hara, Y., Koji, T., Shibata, Y., Nakane, P. K. & Kato, I. (1998) Differential expression of IFN-gamma, IL-4, IL-10, and IL-1beta mRNAs in decalcified tissue sections of mouse lipopolysaccharide-induced periodontitis mandibles assessed by in situ hybridization. *Histochem Cell Biol* **109**, 339-347.
- Jin, Q., Cirelli, J. A., Park, C. H., Sugai, J. V., Taba, M., Jr., Kostenuik, P. J. & Giannobile, W. V. (2007) RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. *J Periodontol* **78**, 1300-1308. doi:10.1902/jop.2007.070073.
- Jordan, H. V. & Keyes, P. H. (1964) Aerobic, Gram-Positive, Filamentous Bacteria as Etiologic Agents of Experimental Periodontal Disease in Hamsters. *Arch Oral Biol* **9**, 401-414.
- Josefowicz, S. Z. & Rudensky, A. (2009) Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* **30**, 616-625. doi:10.1016/j.immuni.2009.04.009.
- Karimbux, N. Y., Ramamurthy, N. S., Golub, L. M. & Nishimura, I. (1998) The expression of collagen I and XII mRNAs in Porphyromonas gingivalis-induced periodontitis in rats: the effect of doxycycline and chemically modified tetracycline. *J Periodontol* **69**, 34-40. doi:10.1902/jop.1998.69.1.34.
- Katagiri, T. & Takahashi, N. (2002) Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis* **8**, 147-159.

- Kawai, T., Matsuyama, T., Hosokawa, Y., Makihiro, S., Seki, M., Karimbux, N. Y., Goncalves, R. B., Valverde, P., Dibart, S., Li, Y. P., Miranda, L. A., Ernst, C. W., Izumi, Y. & Taubman, M. A. (2006) B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol* **169**, 987-998. doi:10.2353/ajpath.2006.060180.
- Kawashima, N. & Stashenko, P. (1999) Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol* **44**, 55-66.
- Kennedy, J. E. & Polson, A. M. (1973) Experimental marginal periodontitis in squirrel monkeys. *J Periodontol* **44**, 140-144. doi:10.1902/jop.1973.44.3.140.
- Kenworthy, R. & Baverel, M. (1981) Studies of a periodontal tissue lesion in the rat, untreated or treated with chlorhexidine digluconate. *J Clin Periodontol* **8**, 349-358.
- Kesavalu, L., Sathishkumar, S., Bakthavatchalu, V., Matthews, C., Dawson, D., Steffen, M. & Ebersole, J. L. (2007) Rat model of polymicrobial infection, immunity, and alveolar bone resorption in periodontal disease. *Infect Immun* **75**, 1704-1712. doi:10.1128/IAI.00733-06.
- Klausen, B. (1991) Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol* **62**, 59-73. doi:10.1902/jop.1991.62.1.59.
- Klausen, B., Evans, R. T. & Sfintescu, C. (1989) Two complementary methods of assessing periodontal bone level in rats. *Scand J Dent Res* **97**, 494-499.
- Kubota, T., Nomura, T., Takahashi, T. & Hara, K. (1996) Expression of mRNA for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontitis-affected human gingival tissue. *Arch Oral Biol* **41**, 253-262.
- Liacini, A., Sylvester, J., Li, W. Q. & Zafarullah, M. (2005) Mithramycin downregulates proinflammatory cytokine-induced matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther* **7**, R777-783. doi:10.1186/ar1735.
- Lindhe, J., Hamp, S. E. & Loe, H. (1975) Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. A 4-year clinical, roentgenographical and histometrical study. *J Periodontal Res* **10**, 243-255.
- Liu, Y. F., Wu, L. A., Wang, J., Wen, L. Y. & Wang, X. J. (2010) Micro-computerized tomography analysis of alveolar bone loss in ligature- and nicotine-induced experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res* **45**, 714-719. doi:10.1111/j.1600-0765.2010.01290.x.
- Loe, H. (1967) The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol* **38**, Suppl:610-616. doi:10.1902/jop.1967.38.6.610.
- Loe, H., Theilade, E., Jensen, S. B. & Schiott, C. R. (1967) Experimental gingivitis in man. 3. Influence of antibiotics on gingival plaque development. *J Periodontal Res* **2**, 282-289.
- Lohinai, Z., Benedek, P., Feher, E., Gyorfi, A., Rosivall, L., Fazekas, A., Salzman, A. L. & Szabo, C. (1998) Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. *Br J Pharmacol* **123**, 353-360. doi:10.1038/sj.bjp.0701604.
- Ma, J., Chen, T., Mandelin, J., Ceponis, A., Miller, N. E., Hukkanen, M., Ma, G. F. & Konttinen, Y. T. (2003) Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci* **60**, 2334-2346. doi:10.1007/s00018-003-3020-0.
- Makela, M., Salo, T., Uitto, V. J. & Larjava, H. (1994) Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J Dent Res* **73**, 1397-1406.
- Meyle, J. & Chapple, I. (2015) Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* **2000** **69**, 7-17. doi:10.1111/prd.12104.
- Naito, T., Hosokawa, R. & Yokota, M. (1998) Three-dimensional alveolar bone morphology analysis using computed tomography. *J Periodontol* **69**, 584-589. doi:10.1902/jop.1998.69.5.584.
- Nishida, E., Hara, Y., Kaneko, T., Ikeda, Y., Ukai, T. & Kato, I. (2001) Bone resorption and local interleukin-1alpha and interleukin-1beta synthesis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *J Periodontal Res* **36**, 1-8.
- Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S. & Johnson, N. W. (2005) Periodontal diseases. *Lancet* **366**, 1809-1820. doi:10.1016/S0140-6736(05)67728-8.

- Polak, D., Wilensky, A., Shapira, L., Halabi, A., Goldstein, D., Weiss, E. I. & Houry-Haddad, Y. (2009) Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response. *J Clin Periodontol* **36**, 406-410. doi:10.1111/j.1600-051X.2009.01393.x.
- Preshaw, P. M. & Taylor, J. J. (2011) How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol* **38 Suppl 11**, 60-84. doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01671.x.
- Repeke, C. E., Ferreira, S. B., Jr., Claudino, M., Silveira, E. M., de Assis, G. F., Avila-Campos, M. J., Silva, J. S. & Garlet, G. P. (2010) Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and its receptors CCR1+ and CCR5+ in RANKL+ cell migration throughout experimental periodontitis in mice. *Bone* **46**, 1122-1130. doi:10.1016/j.bone.2009.12.030.
- Roberts, F. A. & Darveau, R. P. (2015) Microbial protection and virulence in periodontal tissue as a function of polymicrobial communities: symbiosis and dysbiosis. *Periodontol 2000* **69**, 18-27. doi:10.1111/prd.12087.
- Rossi, D. & Zlotnik, A. (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* **18**, 217-242. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.217.
- Rovin, S., Costich, E. R. & Gordon, H. A. (1966) The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *J Periodontal Res* **1**, 193-204.
- Rowe, D. J. & Bradley, L. S. (1981) Quantitative analyses of osteoclasts, bone loss and inflammation in human periodontal disease. *J Periodontal Res* **16**, 13-19.
- Saadi-Thiers, K., Huck, O., Simonis, P., Tilly, P., Fabre, J. E., Tenenbaum, H. & Davideau, J. L. (2013) Periodontal and systemic responses in various mice models of experimental periodontitis: respective roles of inflammation duration and *Porphyromonas gingivalis* infection. *J Periodontol* **84**, 396-406. doi:10.1902/jop.2012.110540.
- Sakaguchi, S. (2005) Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* **6**, 345-352. doi:10.1038/ni1178.
- Sakaki, H., Matsumiya, T., Kusumi, A., Imaizumi, T., Satoh, H., Yoshida, H., Satoh, K. & Kimura, H. (2004) Interleukin-1beta induces matrix metalloproteinase-1 expression in cultured human gingival fibroblasts: role of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2. *Oral Dis* **10**, 87-93.
- Sallusto, F. & Baggiolini, M. (2008) Chemokines and leukocyte traffic. *Nat Immunol* **9**, 949-952. doi:10.1038/ni.f.214.
- Samejima, Y., Ebisu, S. & Okada, H. (1990) Effect of infection with *Eikenella corrodens* on the progression of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res* **25**, 308-315.
- Saxe, S. R., Greene, J. C., Bohannon, H. M. & Vermillion, J. R. (1967) Oral debris, calculus, and periodontal disease in the beagle dog. *Periodontics* **5**, 217-225.
- Schroeder, H. E. & Lindhe, J. (1980) Conditions and pathological features of rapidly destructive, experimental periodontitis in dogs. *J Periodontol* **51**, 6-19. doi:10.1902/jop.1980.51.1.6.
- Schrum, S., Probst, P., Fleischer, B. & Zipfel, P. F. (1996) Synthesis of the CC-chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, and RANTES is associated with a type 1 immune response. *J Immunol* **157**, 3598-3604.
- Seto, H., Ninomiya, M. & Nagata, T. (2006) [Alveolar bone resorption in animal models of periodontitis]. *Clin Calcium* **16**, 248-254. doi:10.1007/s12010-006-0248-2.
- Seymour, G. J. & Taylor, J. J. (2004) Shouts and whispers: An introduction to immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol 2000* **35**, 9-13. doi:10.1111/j.0906-6713.2004.00355.x.
- Sharma, A., Inagaki, S., Honma, K., Sfintescu, C., Baker, P. J. & Evans, R. T. (2005) *Tannerella forsythia*-induced alveolar bone loss in mice involves leucine-rich-repeat BspA protein. *J Dent Res* **84**, 462-467.
- Silva, T. A., Garlet, G. P., Fukada, S. Y., Silva, J. S. & Cunha, F. Q. (2007) Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res* **86**, 306-319.
- Socransky, S. S. (1977) Microbiology of periodontal disease -- present status and future considerations. *J Periodontol* **48**, 497-504. doi:10.1902/jop.1977.48.9.497.

- Sorsa, T., Mantyla, P., Ronka, H., Kallio, P., Kallis, G. B., Lundqvist, C., Kinane, D. F., Salo, T., Golub, L. M., Teronen, O. & Tikanoja, S. (1999) Scientific basis of a matrix metalloproteinase-8 specific chair-side test for monitoring periodontal and peri-implant health and disease. *Ann N Y Acad Sci* **878**, 130-140.
- Taddei, S. R., Queiroz-Junior, C. M., Moura, A. P., Andrade, I., Jr., Garlet, G. P., Proudfoot, A. E., Teixeira, M. M. & da Silva, T. A. (2013) The effect of CCL3 and CCR1 in bone remodeling induced by mechanical loading during orthodontic tooth movement in mice. *Bone* **52**, 259-267. doi:10.1016/j.bone.2012.09.036.
- Teitelbaum, S. L. (2000) Bone resorption by osteoclasts. *Science* **289**, 1504-1508.
- Tonetti, M. S., Freiburghaus, K., Lang, N. P. & Bickel, M. (1993) Detection of interleukin-8 and matrix metalloproteinases transcripts in healthy and diseased gingival biopsies by RNA/PCR. *J Periodontal Res* **28**, 511-513.
- Ukai, T., Mori, Y., Onoyama, M. & Hara, Y. (2001) Immunohistological study of interferon-gamma- and interleukin-4-bearing cells in human periodontitis gingiva. *Arch Oral Biol* **46**, 901-908.
- Van Dyke, T. E. & Serhan, C. N. (2003) Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res* **82**, 82-90.
- von Stechow, D., Balto, K., Stashenko, P. & Muller, R. (2003) Three-dimensional quantitation of periradicular bone destruction by micro-computed tomography. *J Endod* **29**, 252-256. doi:10.1097/00004770-200304000-00005.
- Wei, S., Kitauro, H., Zhou, P., Ross, F. P. & Teitelbaum, S. L. (2005) IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest* **115**, 282-290. doi:10.1172/JCI23394.
- Weiner, G. S., DeMarco, T. J. & Bissada, N. F. (1979) Long term effect of systemic tetracycline administration on the severity of induced periodontitis in the rat. *J Periodontol* **50**, 619-623. doi:10.1902/jop.1979.50.12.619.
- Wilensky, A., Gabet, Y., Yumoto, H., Hourri-Haddad, Y. & Shapira, L. (2005) Three-dimensional quantification of alveolar bone loss in Porphyromonas gingivalis-infected mice using micro-computed tomography. *J Periodontol* **76**, 1282-1286. doi:10.1902/jop.2005.76.8.1282.
- Woessner, J. F., Jr. & Gunja-Smith, Z. (1991) Role of metalloproteinases in human osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* **27**, 99-101.
- Yang, S., Madyastha, P., Ries, W. & Key, L. L. (2002) Characterization of interferon gamma receptors on osteoclasts: effect of interferon gamma on osteoclastic superoxide generation. *J Cell Biochem* **84**, 645-654.
- Yu, J. J., Ruddy, M. J., Wong, G. C., Sfintescu, C., Baker, P. J., Smith, J. B., Evans, R. T. & Gaffen, S. L. (2007) 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* **109**, 3794-3802. doi:10.1182/blood-2005-09-010116.
- Yu, X., Antoniades, H. N. & Graves, D. T. (1993) Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human inflamed gingival tissues. *Infect Immun* **61**, 4622-4628.
- Yu, X., Huang, Y., Collin-Osdoby, P. & Osdoby, P. (2004) CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. *J Bone Miner Res* **19**, 2065-2077. doi:10.1359/JBMR.040910.
- Yuan, H., Gupte, R., Zekha, S. & Amar, S. (2011) Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand antagonists inhibit tissue inflammation and bone loss in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol* **38**, 1029-1036. doi:10.1111/j.1600-051X.2011.01780.x.

FIGURE LEGENDS:

Figure 1: Linear measurements illustrations. A - sagittal axis. B - transaxial axis. M1- First molar, M2- Second molar; M3 Third molar

Figure 2- Means and standard deviations of linear measurements with micro ct. A – Buccal; B – Lingual; C – Furcation. * indicate significant differences between groups (ANOVA, Tukey, $P < 0.05$).

Figure 3 - Means and standard deviations of BV (A) BV/ TV (B), as well as intergroup comparisons. * indicate significant differences between groups (ANOVA, Tukey, $P < 0.05$). BV = bone volume; TV= tissue volume.

Figure 4 - Means and standard deviations of attachment loss and bone remaining with histology. * indicate significant differences between groups (ANOVA, Tukey, $P < 0.05$).

Figure 5 - Periodontal tissues at the furcation region of the first molar of control groups (A, B), 10d (C, D) 15d (E, F), 20d (G, H), 30d (I, J) and 45d (L, M). Colour: hematoxylin and eosin. Original magnification = 10x (A, C, G, M, I, L); 20X (B, D, F, H, J, M)

Table 1:

<i>Control Group</i> : no periodontal induction. (n = 5)
<i>Group L-1</i> : one day after the induction of periodontal disease (n = 5);
<i>Group L-3</i> : three days after the induction of periodontal disease (n=5);
<i>Group L-5</i> : five days after the induction of periodontal disease (n=5);
<i>Group L-7</i> : seven days after the induction of periodontal disease (n=5);
<i>Group L-10</i> : ten days after the induction of periodontal disease (n=5);
<i>Group L-15</i> : fifteen days after the induction of periodontal disease (n=5);
<i>Group L-20</i> : twenty days after the induction of periodontal disease (n=5);
<i>Group L-30</i> : thirty days after the induction of periodontal disease (n=5);
<i>Group L-45</i> : forty-five days after the induction of periodontal disease (n=5);

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5