TALITA PEREIRA PRATES

**PAPEL DOS RECEPTORES TIPO NOD NA MODULAÇÃO DA
REABSORÇÃO ÓSSEA EM MODELO DE PERIODONTITE
EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Yasuyo
Fukada Alves

Ribeirão Preto

2014

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Prates, Talita Pereira

Papel dos receptores tipo NOD na modulação da reabsorção óssea em modelo de periodontite experimental

Prates, Talita Pereira, Ribeirão Preto, 2014.

123p.: il, 30 cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Fukada, Sandra Yasuyo

1. biofilme bacteriano, 2. reabsorção óssea, 3. receptores NOD, 4. catepsina K, 5. osteoimunologia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

PRATES, TP. Papel dos receptores tipo NOD na modulação da reabsorção óssea em modelo de periodontite experimental

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Odontopediatria

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

TALITA PEREIRA PRATES

- Nascimento 3 de março 1989 – Jacuí/MG
- Filiação Jair da Cruz Prates
Marina Batista Pereira Prates
- 2008-2011 Curso de Graduação
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo – FORP/USP
- 2010-2011 Iniciação Científica – Bolsista FAPESP
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo – FORP/USP
- 2010-2011 Aperfeiçoamento em Reabilitação Estética
Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas da Região de
Ribeirão Preto- APCD/RP
- 2011-2011 Estágio no Distrito Especial Indígena do Xingu
- 2011-2011 Iniciação Científica – Bolsista CNPq
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo – FORP/USP
- 2012-2013 Aperfeiçoamento em Atendimento Odontológico a Pacientes
Especiais.
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP/USP
- 2012-2014 Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Odontologia
Área de Concentração: Odontopediatria
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo- FORP/USP

Ainda que eu tenha o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.

1 Coríntios 13.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Marina Batista Pereira Prates e Jair da Cruz Prates, que sempre batalharam pela minha formação e apoiaram minhas escolhas. Tenho certeza de que conquistarei qualquer objetivo com a tranquilidade e segurança que me transmitem. Vocês são muito especiais para mim! Amo muito vocês!

Ao meu namorado, Thiago Abud Fonseca, obrigada por todo carinho, paciência e por sempre caminhar e superar os desafios ao meu lado. Amor, você é um presente de Deus em minha vida, meu porto seguro! Te amo muito e sempre!

À minha família e amigos que incondicionalmente apoiaram-me, sempre estiveram ao meu lado e torceram pelo meu sucesso!

AGRADECIMENTOS

*“Por tudo o que tens feito,
Por tudo o que vais fazer,
Por tuas promessas e tudo o que és,
Eu quero te agradecer,
Com todo o meu ser!
Te agradeço, meu senhor!”*

(Dennis Jernigan. Versão: Ana Bessa)

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual diretor Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros, por contribuir com minha formação acadêmica desde a graduação.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da coordenadora, Prof^a. Dr^a. Léa Assed Bezerra da Silva e da vice-coordenadora Prof^a. Dr^a. Raquel Assed Bezerra Segato.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Sandra Yasuyo Fukada Alves, pela honra de ser sua orientanda, pelo exemplo de dedicação e competência. Muito obrigada por contar com a sua amizade, por todo o aprendizado, atenção, compreensão, apoio e, principalmente, pela confiança. Enfim, obrigada pela grande contribuição com a minha formação científica.

Aos professores do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo por todos os ensinamentos e pela oportunidade de conviver com vocês.

Aos professores da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira, Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, Prof. Dr. José Carlos Alves Filho e Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha, por me recepcionarem de braços abertos em seus laboratórios.

Ao professor Dr. Dario Simões Zamboni da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pelo apoio ao projeto com os animais deficientes NOD1 e NOD2.

Ao professor Dr. Julio Scharfstein da Universidade Federal do Rio de Janeiro e ao pós-graduando Erivan Schnaider Ramos Junior por terem nos concedido a cepa da bactéria utilizada no experimento.

Ao professor Dr. Sérgio Luiz de Souza Salvador da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e Marina Del Arco por terem me acolhido com muito carinho, caminhado ao meu lado durante toda a padronização e cultivo das bactérias.

Aos professores da banca, por terem aceitado o convite e pela atenção dispensada na leitura da dissertação.

Aos pós-graduandos em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e, aos da Faculdade de Medicina e de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela convivência, trocas de experiências, por todo apoio e amizade.

Às minhas amigas de iniciação científica, Thaise Mayumi Taira, e de turma de mestrado, Letícia Andreotti Bignardi, por toda ajuda durante a execução laboratorial desse projeto.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, da Clínica de Pacientes Especiais, da Clínica I, da Seção de Pós-graduação, enfim, todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e aos funcionários da Faculdade de Farmácia e Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela agradável convivência, pela atenção e por estarem sempre a disposição.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro para que esse projeto fosse executado.

Por fim, agradeço a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a concretização deste trabalho e, também, a todos que passaram de alguma forma por minha vida durante esse período. Muito obrigada!

Prates, TP. **Papel dos receptores tipo NOD na modulação da reabsorção óssea em modelo de periodontite experimental.** 2014. 123f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

RESUMO

O biofilme bacteriano é o agente etiológico primário no desenvolvimento da resposta inflamatória observada na doença periodontal. Os receptores do tipo NOD (NLRs) são proteínas citosólicas que reconhecem componentes microbianos presentes no citoplasma liberados por bactérias invasoras. Sabendo que bactérias periodontopatogênicas têm a capacidade de invadir e colonizar diversas células do tecido periodontal, o presente projeto tem o objetivo de estudar a participação dos receptores do tipo NOD (NOD1 e NOD2) no reconhecimento das bactérias *Porphyromonas gingivalis*, na modulação da resposta imune e no processo de reabsorção óssea. Camundongos isogênicos machos da linhagem C57BL/6 (WT) e camundongos deficientes para o receptor NOD1 (NOD1^{-/-}) e receptor NOD2 (NOD2^{-/-}) foram infectados com *Porphyromonas gingivalis* utilizando um modelo experimental de doença periodontal. O grau de reabsorção óssea foi avaliado por análise morfométrica macroscópica e histológica da maxila, além da quantificação do número de osteoclastos na crista óssea alveolar. O grau de inflamação local foi realizado por contagem do número total de bactérias orais, quantificação de neutrófilos no tecido gengival (MPO) e avaliação dos mediadores inflamatórios por ELISA. Foi também avaliada a expressão de marcadores osteogênicos e osteoclastogênicos no tecido gengival pela técnica de qPCR. Animais NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} apresentaram menor delta de reabsorção óssea quando comparados aos animais WT. Animais NOD2^{-/-} infectados apresentaram debilitado controle bacteriano quando comparados aos animais WT infectados. Animais NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} infectados apresentaram baixa expressão de Cxcl1 e MPO quando comparados aos animais WT infectados. Além disso, foi observado que animais NOD2^{-/-} infectados apresentaram reduzida produção de TNF- α e elevada produção de IL-10 quando comparados aos animais WT infectados. Não foi detectado diferença estatística na expressão de fatores osteogênicos, Runx2 e osteocalcina, entre animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} infectados. Embora não houve diferença no número de células TRAP positivas presentes na crista óssea alveolar entre os grupos no tempo avaliado, animais WT infectados apresentaram elevada expressão gênica de RANKL/OPG quando comparados aos animais NOD2^{-/-} infectados. Além disso, a expressão de marcadores de atividades dos osteoclastos, cathepsina k e matrix metaloproteinase-9, foi significativamente baixa nos animais NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} infectados quando comparados aos animais WT infectados. Esses resultados permitem sugerir que independente das variáveis observadas, verificamos que a ausência dos dois receptores impede a rápida progressão da reabsorção óssea alveolar observada na periodontite, portanto os receptores NOD1 e NOD2 contribuem para progressão da reabsorção óssea no modelo experimental de periodontite.

Palavras-chave: biofilme bacteriano, reabsorção óssea, receptores NOD, cathepsina K, osteoimunologia.

Prates, TP. **The role of NOD-like receptors in the modulation of bone resorption in experimental periodontitis model.** 2014. 123f. Dissertation (Mastership)- School of Dentistry of Ribeirão Preto from University of São Paulo - SP- Brazil, 2014.

ABSTRACT

The bacterial biofilm has been identified as an etiological agent in the pathogenesis of periodontal disease. The NOD-like receptors (NLRs) are cytoplasmic proteins that sense microbial by products released by invasive bacteria. Since periodontopathogenic bacteria are able to invade and colonize some periodontal tissue cells, the purpose of this study is to determine the role of NOD1 and NOD2 receptors in the recognition of invasive periodontopathogenic bacteria such as *Porphyromonas gingivalis*, modulating the immune response and bone resorption. Isogenic strain C57BL/6 males (WT), NOD1 (NOD1^{-/-}) and NOD2 (NOD2^{-/-}) knockout mice were infected with *Porphyromonas gingivalis* in an experimental model of periodontal disease. Alveolar bone resorption was evaluated by macroscopic and histological morphometric analysis, quantification of osteoclasts numbers in bone crest alveolar. Immune inflammatory response was evaluated by, bacterial load, neutrophils quantification and inflammatory mediators levels by ELISA. We also evaluated the osteogenic and osteoclastogenic markers expression in gingival tissue by Real time PCR techniques. NOD1^{-/-} and NOD2^{-/-} animals showed lower bone resorption when compared to WT animals. NOD2^{-/-} infected animals expressed higher bacterial load compared to WT infected ones. NOD1^{-/-} and NOD2^{-/-} infected animals presented lower Cxcl1 and MPO levels compared to WT infected animals. In addition, NOD2^{-/-} infected animals presented lower level of TNF- α and higher level of IL-10 when compared to WT infected animals. There was no significant difference in the osteogenic factors expression, Runx2 and osteocalcin, when compared NOD1^{-/-} and NOD2^{-/-} infected animals to WT infected ones. Although there was no difference in TRAP-positive cells number evaluated in the alveolar bone crest among the studied groups, WT infected animals showed elevated ratio RANKL/OPG when compared to NOD2^{-/-} infected animals. Moreover, the expression of osteoclasts activity markers, cathepsin k and matrix metalloproteinase-9, was significantly lower in NOD1^{-/-} and NOD2^{-/-} infected animals compared to WT infected ones. These results suggest that NOD1 and NOD2 receptors contribute to progression of bone resorption in experimental model of periodontitis, since the lack of NOD like receptors impair the bone resorption.

Key words: bacterial biofilm, bone resorption, NOD receptors, cathepsin K, osteoimmunology.

LISTA DE ESQUEMAS, FOTOS E FIGURAS

Esquema 1.	Os domínios estruturais de Nod1 e Nod2.....	36
Esquema 2.	Esquema demonstrando a presença de mucopeptídeos iE-DAP e MDP na camada de peptidoglicana	37
Esquema 3.	Modelo de reconhecimento de iE-DAP e MDP por NOD1 e NOD2.....	38
Esquema 4.	Representação do protocolo experimental do modelo de doença periodontal.....	52
Foto 1.	Foto do crescimento em massa da bactéria <i>Porphyromonas gingivalis</i> (W83) em meio Agar-BHI.....	53
Foto 2.	Foto da hemi-maxila demonstrando a delimitação da área de reabsorção óssea alveolar.....	55
Foto 3.	Foto de corte histológico da hemi-maxila demonstrando como foi realizada a análise histomorfométrica.....	57
Figura 1.	Determinação da expressão gênica de Nod1 e Nod2.....	65
Figura 2.	Avaliação do peso dos animais durante o período experimental.....	67
Figura 3.	Medida da área de reabsorção óssea alveolar maxilar por análise macroscópica.....	68
Figura 4.	Delta da área de reabsorção óssea alveolar maxilar.....	69
Figura 5.	Fotos representativas da reabsorção óssea alveolar maxilar.....	70
Figura 6.	Reabsorção da crista óssea alveolar maxilar mensurada em cortes histológicos.....	71
Figura 7.	Fotos representativas de cortes histológicos demonstrando a reabsorção da crista óssea alveolar das hemi-maxilas.....	72
Figura 8.	Quantificação total de bactérias orais de animais WT, NOD1 ^{-/-} e NOD2 ^{-/-} infectados.....	73
Figura 9.	Determinação da expressão gênica de Cxcl1.....	74
Figura 10.	Recrutamento de neutrófilos quantificados no tecido gengival.....	75
Figura 11.	Quantificação de citocina inflamatória IFN- γ no tecido gengival.....	76
Figura 12.	Quantificação de citocina inflamatória IL-10 no tecido gengival.....	76
Figura 13.	Quantificação de citocina inflamatória TNF- α no tecido gengival.....	77
Figura 14.	Determinação da expressão gênica de marcadores da diferenciação osteogênica.....	78
Figura 15.	Determinação da expressão gênica de marcadores osteoclastogênicos.....	80
Figura 16.	Determinação da expressão gênica de <i>TNFSF11A</i> (RANK) e Sdf1/Cxcl12.....	82

Figura 17.	Quantificação do número de células TRAP positivas.....	83
Figura 18	Fotos representativas de cortes histológicos das hemi-maxilas demonstrando o osteoclasto corado com TRAP.....	83
Figura 19.	Determinação da expressão gênica de marcadores da atividade dos osteoclastos.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α : alfa

ANOVA: análise de variância

ApoE: Apolipoprotein E

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar (complementar deoxyribonucleic acid)

BHI: brain heart infusion

BSA: albumina bovina sérica (bovine serum albumin)

β : beta

C: celsius

CT: cycle threshold

CMC: carboximetilcelulose

CARD: caspase-activating and recruitment domain

COA: crista óssea alveolar

Ctsk: catepsina K

Δ : delta

DP: Doença Periodontal

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

EDTA: Ethylenediamine Tetracetic Acid

Foxp3: Forkhead box P3

γ : gama

Gata3: Guanine-Adenine-Thymine-Adenine - Fator de transcrição com capacidade se ligar à sequência de DNA GATA

g: grama (s)

$^{\circ}$: graus

HE: hematoxilina e eosina

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

IL- : interleucina-

IFN- γ :Interferon- γ

iE-DAP: γ -D-glutamyl-meso-diaminopimélico (γ -d-Glu-*meso*-DAP)

JCE: junção cimento-esmalte

LRRs: repetições ricas em leucina (leucine-rich repeats domain)

μ m: micrometro (s)

μ g: micrograma (s)

μ L: microlitro (s)

MDP: muramil dipeptídeo (Muramyl dipeptide)

MPO: mieloperoxidase

mg: miligrama (s)

min: minuto (s)

ml: mililitro (s)

mm²: milímetro(s) quadrado (s)

M-CSF: fator estimulador de colônias de macrófagos

MMP: matriz metaloproteinase

MyD88: gene 88 para resposta primária a diferenciação mieloide (myeloid differentiation primary response gene (88))

nm: nanômetro

NF-κB: fator de transcrição nuclear kappa B (nuclear factor kappa B)

NLRs: receptores tipo NOD (Nod-like receptors)

NOD: nucleotide-binding oligomerization domain

NOD1^{-/-}: deficiente para receptor NOD1

NOD2^{-/-}: deficiente para receptor NOD2

PBS: tampão fosfato salina

PGN: peptideoglicana

PRRs: receptores de reconhecimento de padrões moleculares

pH: potencial hidrogeniônico

qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa (quantitative polymerase chain reaction)

q.s.p: quantidade suficiente para

rpm: rotações por minuto

RANKL: Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear (NF)-κB

RIP2: Receptor-interacting protein 2

RORγt: Retinoic acid-related orphan receptor gamma

RNA: ácido ribonucleico (ribonucleic acid)

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro

s: segundo (s)

Tbet: T-box expressed in T cells

TNF-α: Fator de necrose tumoral-α

TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato (tartrate-resistant acid phosphatase)

TMB: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidine

TLRs: receptores tipo Toll (Toll-like receptors)

WT: wild-type

UFC: unidade formadora de colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1. Doença Periodontal.....	27
1.2. Patogênese da Doença Periodontal.....	28
1.3. Modelos de Indução de Doença Periodontal.....	31
1.4. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	32
1.5. Receptores de reconhecimento padrão e doença periodontal.....	33
1.6. Receptores de reconhecimento padrão e fatores modificadores da reabsorção óssea.....	41
2. PROPOSIÇÃO.....	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1 Animais Experimentais.....	51
3.2 Distribuição dos animais nos grupos experimentais.....	51
3.3 Indução da doença periodontal experimental.....	52
3.3.1 Modelo experimental.....	52
3.3.2 Cultura de bactérias <i>Porphyromonas gingivalis</i>	53
3.4 Quantificação do número total de bactérias orais.....	54
3.5 Obtenção das peças cirúrgicas.....	54
3.6 Análise da reabsorção óssea alveolar.....	55
3.6.1 Análise morfométrica macroscópica da extensão da reabsorção óssea alveolar.....	55
3.6.2 Análise histomorfométrica da extensão da reabsorção da crista óssea alveolar e determinação do número de osteoclastos.....	56
3.7 Avaliação da resposta imune.....	57
3.7.1 Avaliação da expressão gênica: extração de RNA, síntese de cDNA e qPCR em tempo real.....	57
3.7.1.1 Processamento das amostras e extração de RNA.....	57
3.7.1.2 Síntese de cDNA.....	58
3.7.1.3 qPCR em tempo real.....	58
3.7.2 Quantificação de citocinas pelo método de ELISA.....	59
3.7.3 Quantificação de neutrófilos no tecido gengival.....	60
4. Análise Estatística.....	61
4. RESULTADOS.....	63
4.1 Expressão gênica dos receptores NOD após periodontite experimental em animais WT.....	65
4.2 Controle de peso corpóreo após infecção com <i>Porphyromonas gingivalis</i>	65

4.3 Participação dos receptores intracelulares NOD1 e NOD2 na perda óssea alveolar induzida por <i>Porphyromonas gingivalis</i>	68
4.4 Importância dos receptores NOD para o controle bacteriano oral.....	73
4.5 Determinação da resposta inflamatória no local de infecção com <i>Porphyromonas gingivalis</i>	75
4.6 Avaliação de marcadores da diferenciação osteogênica em animais NOD1 ^{-/-} e NOD2 ^{-/-} infectados com <i>Porphyromonas gingivalis</i>	77
4.7 Avaliação de marcadores osteoclastogênicos em animais NOD1 ^{-/-} e NOD2 ^{-/-} infectados com <i>Porphyromonas gingivalis</i>	79
4.8 Avaliação da osteoclastogênese após infecção com <i>Porphyromonas gingivalis</i>	82
4.9 Avaliação de marcadores da atividade dos osteoclastos em animais NOD1 ^{-/-} e NOD2 ^{-/-} infectados com <i>Porphyromonas gingivalis</i>	84
5. DISCUSSÃO.....	85
6. CONCLUSÃO.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
ANEXO.....	121

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença Periodontal

De todas as partes do corpo humano, a cavidade bucal é aquela que apresenta a maior diversidade de microrganismos. Mais de 300 espécies bacterianas compõem a microbiota bucal, as quais são capazes de aderir à superfície do dente e colonizar a placa subgengival (Slots, 1986). A Doença Periodontal (DP) é considerada um grande problema de saúde pública. Estima-se que esta doença seja a infecção crônica mais prevalente em humanos (Slade et al., 2000), além de ser uma das formas mais predominantes de doença que afeta estrutura óssea (Baker, 2000). Segundo um estudo realizado pela Organização Mundial da Saúde, a prevalência de DP grave na população mundial é de 10-15% (Petersen e Ogawa, 2005). No Brasil, de acordo com a pesquisa nacional de saúde bucal realizada pelo Ministério da Saúde, a alteração mais prevalente em todos os grupos etários foi o cálculo dental e, aproximadamente 30% da população adulta possui bolsas periodontais (Projeto SBBrasil, 2010).

Doença periodontal é um termo genérico designado a todo processo patológico que envolve o periodonto (do grego *peri* = ao redor, *odonto* = dente). Definem-se como periodonto as estruturas adjacentes ao elemento dental que o protegem (gengiva) e o sustentam (cimento, osso alveolar e ligamento periodontal). É caracterizada por um processo inflamatório e, em casos graves, destrutivo dos tecidos que compõem o periodonto, manifestando-se clinicamente através de gengivite e periodontite (Honda et al., 2006).

Apesar das bactérias periodontopatogênicas serem imprescindíveis para a progressão da doença periodontal e desencadeamento de reações inflamatórias nos tecidos que compõem o periodonto, alguns fatores associados ao hospedeiro tais como, doenças sistêmicas (Bjelland et al., 2002; de Pablo et al., 2009), herança genética (Michalowicz et al., 2000), fumo de tabaco (Ng e Leung, 2008a; Ebersole et al., 2013; Liu et al., 2014), estresse emocional (Ng e Leung, 2008b) e obesidade (Zhu et al., 2014) estão envolvidos na determinação da susceptibilidade, na progressão da doença e na resposta ao tratamento periodontal.

O impacto da DP nas populações não interfere somente na integridade oral, como se pensava até alguns anos atrás. Atualmente sabe-se que a saúde bucal reflete diretamente na saúde geral do indivíduo, assim como diversas alterações

sistêmicas geram repercussões na cavidade bucal. Encontra-se na literatura diversos trabalhos que demonstram a capacidade da doença periodontal predispor ou agravar algumas doenças extra-orais sistêmicas, como doenças cardiovasculares, artrite reumatóide e diabetes mellitus (Bartold et al., 2005; Beck e Offenbacher, 2005; Popescu et al., 2013). Além disso, estudos epidemiológicos têm demonstrado que parto prematuro e bebês com baixo peso ao nascimento podem estar associados com a doença periodontal materna (Offenbacher et al., 1996; Jeffcoat et al., 2001; Leon et al., 2007).

1.2. Patogênese da Doença Periodontal

A primeira análise microscópica da complexa microbiota gengival foi realizada, em 1683, por Van Leeuwenhoek (Tal, 1980). A partir dessa descoberta, houve um crescente interesse em busca de conhecimento detalhado da microbiota bucal em vários estudos da literatura. O primeiro estudo que demonstrou relação direta entre o acúmulo de biofilme dental e doença periodontal foi realizado por Loe et al. (1965).

O biofilme dental é uma comunidade de microrganismos embebidos em matriz orgânica constituída por células descamadas, leucócitos, glicoproteínas da saliva e substrato alimentar, capaz de sofrer influência do meio externo mediado pelo hospedeiro. É o principal fator iniciante do processo inflamatório periodontal. Caracterizado por uma entidade estrutural, de ocorrência natural, resultante da colonização e do crescimento de microrganismos sobre a superfície dos dentes e tecidos moles. Localiza-se em toda a cavidade oral, principalmente no sulco gengival onde a limpeza natural realizada pela saliva, pela língua e pelos lábios não tem uma ação eficiente (Mombelli, 2003; Kolenbrander et al., 2010; Ammann et al., 2013).

O desenvolvimento da doença periodontal é causado por um grupo de bactérias predominantemente anaeróbias Gram-negativo relativamente restrito no biofilme subgengival que são capazes de invadir células não fagocíticas presentes no tecido periodontal mole, como células epiteliais e fibroblastos. Estas bactérias são denominadas periodontopatogênicas e sua quantidade aumenta conforme a progressão da doença periodontal. Podem atuar isoladamente ou em combinação participando da perda de inserção do tecido conjuntivo e da perda óssea, dentre as quais se destacam: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella sp*, *Streptococcus*

intermedius e *Treponema denticola* (Slots, 1986; Grossi et al., 1994; Haffajee e Socransky, 1994; Socransky et al., 1998).

A interação inicial entre essas bactérias periodontopatogênicas presentes no biofilme dental e as células do epitélio oral desempenha um papel importante no delicado equilíbrio patógeno-hospedeiro, que pode resultar tanto em estado de saúde gengival, como no estabelecimento e progressão da doença periodontal. As células do epitélio oral constituem a principal barreira física no sulco gengival e atuam também como sensores para o sistema de defesa do hospedeiro. Por isso, para que ocorra a evolução da doença periodontal, a patogenicidade dos microrganismos deve superar a habilidade de defesa do hospedeiro. Caso esse desequilíbrio ocorra, o processo inflamatório poderá afetar o tecido periodontal de proteção, causando a gengivite, ou atingir os tecidos de suporte, desencadeando a periodontite (Mombelli, 2003; Honda et al., 2006; Palmer, 2010).

A gengivite é a manifestação clínica inicial da doença, atinge o tecido periodontal de proteção e não está associada com a destruição do tecido ósseo alveolar. É caracterizada por um processo reversível, caso a placa bacteriana seja removida. Nesta fase, a gengiva apresenta-se hiperemiada, edemaciada e o epitélio do sulco gengival começa a perder integridade, o que permite que algumas bactérias e os seus subprodutos o atravessem e atinjam as estruturas periodontais mais profundas (Kornman, 2008; Offenbacher et al., 2008).

A periodontite, por sua vez, é resultante da progressão de uma gengivite não tratada. É definida pela cronificação do processo inflamatório e por promover reabsorção do osso alveolar. A perda óssea causa instabilidade e consequente mobilidade dental, culminando na sua esfoliação (Offenbacher et al., 2008). À medida que o osso é reabsorvido, há uma maior perda da aderência epitelial causada pela destruição da parte coronal do ligamento periodontal, a qual gera um aprofundamento do sulco gengival, formando uma bolsa periodontal entre o dente e o osso alveolar. A bolsa periodontal propicia um ambiente anaeróbio, que favorece a proliferação de bactérias de alta patogenicidade (Perioli et al., 2004).

Esses microrganismos presentes nos tecidos subgengivais desencadeiam uma resposta inflamatória que pode levar à destruição dos tecidos periodontais do hospedeiro (Page et al., 1997; Kornman, 2008). Diversos estudos têm demonstrado que a persistente resposta imune inflamatória do hospedeiro contra esses

patógenos, mediada pelo balanço entre várias citocinas, favorece a progressão da gengivite para periodontite (Graves, 2008; Liu et al., 2010).

Células residentes (fibroblastos e células epiteliais) e fagócitos (neutrófilos e macrófagos) produzem citocinas no ambiente periodontal após o reconhecimento das bactérias periodontopatogênicas (Garlet et al., 2010). Alguns mediadores como TNF- α , IL-17 e IFN- γ estão associados com a destruição do tecido periodontal pelo fato de sua atividade pró-inflamatória (Baker et al., 1999; Graves e Cochran, 2003; Teng et al., 2005; Cintra et al., 2014), ao passo que IL-10 atenua a progressão da doença (Zhang e Teng, 2006).

Além da resposta imune inata, bactérias periodontopatogênicas levam à mobilização de mecanismos relacionados à imunidade adaptativa. A ativação da resposta adaptativa do hospedeiro inicia com o reconhecimento e processamento do antígeno relacionado ao patógeno pelas células apresentadoras de antígeno, como as células dendríticas. Posteriormente, ocorre a apresentação do mesmo aos linfócitos T por meio da interação do complexo MHC/peptídeo com os seus receptores. Os linfócitos T CD4⁺ se diferenciam e podem seguir distintos caminhos dependendo do estímulo durante a apresentação antigênica (Cutler e Jotwani, 2004).

A resposta imune adaptativa mediada por linfócitos T CD4⁺ auxiliares efetoras (Th) é muito heterogênea. Inicialmente, duas formas polarizadas de resposta Th efetoras foram identificadas, tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2), de acordo com o padrão de citocinas que secretam (Mosmann et al., 1986). As respostas do tipo Th1 são pró-inflamatórias, enquanto as células Th2 estão associadas com propriedades anti-inflamatórias (Murphy e Reiner, 2002; Gaffen e Hajishengallis, 2008). Em seguida, duas novas subpopulações de linfócitos T efetores foram reconhecidas e denominadas de Th17 e Treg. Apresentam papéis antagônicos como efetoras e células supressoras, respectivamente (Weaver e Hatton, 2009).

Os fatores de transcrição para que linfócitos T se diferenciem em Th1, Th2, Th17 e Treg são respectivamente Tbet (Szabo et al., 2000), Gata3 (Zheng e Flavell, 1997), Ror γ t (Yang et al., 2008) e Foxp3 (Fontenot e Rudensky, 2005). Apesar de serem morfolologicamente indistinguíveis e provenientes das mesmas células precursoras, essas células apresentam distintos padrões de citocinas secretadas e, conseqüentemente, diferentes respostas efetoras (Bettelli et al., 2006).

Com base nos relatos acima, recentemente tem sido reconhecida a participação do sistema imunológico no processo da reabsorção óssea. Essa associação resultou em um novo campo da ciência denominado osteoimunologia (Arron e Choi, 2000). A partir desse conhecimento, um grande número de pesquisas tem sido desenvolvido para melhor compreender a patogênese da doença periodontal.

1.3. Modelos de Indução de Doença Periodontal

Para avaliar a patogênese da periodontite, a interação entre o hospedeiro e bactéria e o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos, têm sido propostos na literatura diversos modelos de indução de periodontite em animais (Kesavalu et al., 2007; Graves et al., 2008; de Molon et al., 2012). Os mecanismos de colonização, o papel específico dos fatores de virulência, efeitos de células e mediadores e a etiologia da periodontite podem ser estudados a partir dos modelos em animais (Genco et al., 1998).

Enquanto estudos de periodontite em humanos apresentam dificuldades no controle das variáveis dos pacientes, o modelo experimental de periodontite em animais possui a grande vantagem de simular o processo infeccioso da doença periodontal humana, além de ter um controle maior com relação a fatores que podem influenciar o percurso da doença (Genco et al., 1998).

Para indução da periodontite experimental têm sido propostos alguns modelos: por ligadura (Theodoro et al., 2014), pela injeção da bactéria inativada ou componente relacionado ao patógeno (LPS) no tecido gengival palatal (Madeira et al., 2012) ou pela inoculação via oral de bactérias periodontopatogênicas (Yoshinaka et al., 2014).

A inoculação via oral de bactérias tem sido utilizada em muitos estudos como modelo de indução da periodontite. Nesse modelo pode ser observado a inoculação de apenas um tipo de bactérias, modelo de infecção monomicrobiano (Baker et al., 1994; Garlet et al., 2006) ou até mesmo a mistura de vários periodontopatógenos, modelo polimicrobiano (Kesavalu et al., 2007; Polak et al., 2009).

Considerando as vantagens e desvantagens dos diversos modelos de periodontite experimentalmente induzida, para promover a reabsorção óssea alveolar observada na periodontite, foi utilizado em nosso trabalho o modelo de indução por meio da inoculação via oral monomicrobiana de *Porphyromonas*

gingivalis (W83). Esse modelo tem o inconveniente de apresentar um tempo de indução da reabsorção de no mínimo quatro semanas após a última inoculação (de Molon et al., 2013). Contudo, apresenta várias vantagens: periodontopatógeno conhecido, tempo de infecção preciso e ao contrário da ligadura, não ocasiona trauma mecânico nos tecidos periodontais e permite estudar efeitos induzidos pelos microrganismos sem a interferência de um objeto estranho aos tecidos. Além disso, esse modelo permite caracterizar tipos celulares e mecanismos inflamatórios envolvidos, como também, a cinética da reabsorção óssea (Garlet et al., 2006; 2007).

1.4. *Porphyromonas gingivalis*

Há evidências científicas de que a *Porphyromonas gingivalis* seja o principal agente etiológico das apresentações severas de periodontite crônica (Yang et al., 2004; Kim et al., 2010; Pathirana et al., 2010; Hajishengallis, 2011). Yang et al. (2004) comprovaram a presença dessa bactéria em 85,7% das amostras de 407 pacientes diagnosticados com doença periodontal, sugerindo que essa bactéria esteja intimamente relacionada à patogênese da doença.

Porphyromonas gingivalis é um cocobacilo, Gram negativo, assacarolítico e anaeróbio estrito (Holt et al., 1999). O seu crescimento em meio de cultura forma colônias de 1-2 mm de diâmetro, de cor escura, devido a produção do protoheme, substância responsável pela cor dessas colônias (Haraszthy et al., 2000). Essas bactérias apresentam fatores de virulência, como o lipopolissacarídeo, hemaglutininas, proteases e fímbrias distribuídas de modo uniforme sobre a sua superfície (Slots e Genco, 1984). Há muitas evidências de que a adesão ao tecido do hospedeiro é realizada pelas suas fímbrias, inclusive ao tecido bucal, devido a sua interação adesiva à citoqueratina (Sojar et al., 2002).

Gingipain, secretada por *Porphyromonas gingivalis*, consegue degradar os componentes da matriz celular e das junções celulares, permitindo que a bactéria ultrapasse, desse modo, as barreiras de proteção formadas pelo tecido conjuntivo e pela adesão celular. Essa capacidade de invadir células do tecido bucal permite o seu estabelecimento em locais de anaerobiose (Andrian et al., 2004; Tribble e Lamont, 2010).

Foram encontrados mais de 100 tipos clonais de *Porphyromonas gingivalis* em pacientes com periodontite (Ozmeric et al., 2000; Frandsen et al., 2001).

Porphyromonas gingivalis tem sido classificada em cepas virulentas e avirulentas baseada na habilidade de induzir abscessos necróticos em modelos animais. Essa habilidade é importante na iniciação e progressão da doença periodontal (Socransky e Haffajee, 1992).

Okugawa et al. (2010) observaram que a cepa W83 de *Porphyromonas gingivalis* exerceu forte atividade estimulatória NOD1 e NOD2 quando comparada à cepa ATCC 33277. Essa forte atividade estimulatória pode ser explicada pelo trabalho de Neiders et al. (1989) em que observaram o potencial dessa cepa de induzir abscesso, lesões secundárias, sepse e até mesmo alta frequência de morte de animais ao compará-la com a cepa ATCC 33277. De fato, a cepa W83 possui um importante mecanismo de virulência. Suas proteases são capazes de degradar proteínas C3 e IgG e, dessa forma, impedem que ocorra a sua opsonização pelo sistema complemento (Schenkein et al., 1995).

A cepa W83 foi selecionada em nosso estudo, posto que, além dos relatos acima, foi demonstrada na literatura sua alta capacidade de induzir à reabsorção óssea alveolar quando comparada às outras cepas de *Porphyromonas gingivalis* (Marchesan et al., 2012).

1.5. Receptores de reconhecimento padrão e doença periodontal

O reconhecimento dos agentes infecciosos ocorre através da detecção de componentes altamente conservados nos microrganismos, denominados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs: pathogen-associated molecular patterns). Os PAMPs são moléculas vitais para a sobrevivência dos microrganismos, dentre os quais se pode citar estruturas dos ácidos nucleicos de bactérias e vírus, como CpG DNA e dsRNA, bem como componentes da parede e da membrana bacteriana, como o lipopolissacarídeo (LPS), ácido lipoteicoico e peptidoglicanas (Akira, 2006). O sistema imune é capaz de reconhecer os PAMPs por meio de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs) expressos pelas células que fazem parte ou não do sistema imune, como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. A geração de uma apropriada resposta imune adaptativa ou adquirida é dependente do reconhecimento inicial dos microrganismos patogênicos, através da interação de PAMPs com específico PRRs presente na superfície da célula do hospedeiro ou no compartimento citosólico (Kawai e Akira, 2009).

Os receptores Toll-Like (TLRs : Toll-like receptors) foram a primeira família de PRRs a serem reconhecidas por sua habilidade de detectar uma variedade de patógenos e seus ligantes na superfície celular ou dentro de endossomas (Akira et al., 2006). Nos últimos anos, inúmeros estudos avaliaram o envolvimento dos TLRs na indução da resposta imune e no desenvolvimento e progressão da doença periodontal. Foi demonstrado que diversas células presentes no tecido periodontal, incluindo células do epitélio oral, fibroblasto gengival e células do ligamento periodontal, expressam constitutivamente 9 dos 11 diferentes TLRs identificados em humanos, com particular atenção ao TLR2 e TLR4 (Hatakeyama et al., 2003; Mori et al., 2003; Beklen et al., 2008). A ativação dessas células por ligantes dos TLRs, como LPS e Pam3Cys, induz a produção de uma série de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas (IL-1 β , IL-6, e TNF- α), quimiocinas (CXCL8, CCL2 e CCL17) e defencinas (Kusumoto et al., 2004; Mahanonda et al., 2007; Hosokawa et al., 2008; Lu et al., 2009).

Com relação ao desenvolvimento e progressão da doença periodontal, dois estudos avaliaram o papel do TLR2 e do TLR4 na periodontite experimental induzida pela inoculação oral com *A. Actinomycescomitans* (Gelani et al., 2009; Lima et al., 2010). Foi demonstrado que animais deficientes de TLR2 apresentaram maiores índices de perda óssea e migração celular que o observado em animais controles (Gelani et al., 2009), enquanto animais deficientes de TLR4 apresentaram menores índices de perda óssea e migração celular que o observado em animais controles (Lima et al., 2010). Por outro lado, na periodontite experimental induzida por *P. gingivalis*, foi demonstrado que animais deficientes de TLR2 desenvolveram uma resposta inflamatória menor e apresentaram menos reabsorção óssea (Burns et al., 2006). Sendo assim, a participação dos TLRs diverge quanto ao papel protetor ou deletério, dependendo da espécie da bactéria periodontopatogênica estudada e/ou do tipo de TLR avaliado.

Em um estudo de Wara-aswapati et al. (2013) foi detectada expressão gênica dos receptores TLR2, TLR4 e TLR9 em todas as amostras de tecido gengival após estimulação com *Porphyromonas gingivalis*, porém, os níveis de TLR2 e TLR9 foram significativamente mais altos no grupo de pacientes com periodontite ao compará-lo com o grupo controle. Nas amostras de placa subgengival foi verificada uma correlação entre o número de bactérias *Porphyromonas gingivalis* presentes na placa e a expressão gênica de TLR2 e TLR9.

Tem sido demonstrado o sinergismo entre os TLRs e os receptores intracelulares NOD1 e NOD2 na produção de citocinas pelas células dendríticas e macrófagos (Tada et al., 2005; Park et al., 2007a). Em um estudo de Archer et al. (2010), observaram que animais duplo deficientes para RIPK2 e MyD88 apresentaram uma maior susceptibilidade à infecção com *L. pneumophila* quando comparados aos animais deficientes apenas para MyD88. De fato, Jeon et al. (2012) verificaram uma maior produção de IL-6 e IL-8 em células do ligamento peridontal após a sua estimulação com os agonistas de NOD1 e NOD2, Tri-DAP e MDP, associado com a estimulação de LPS e Pam3CKS4, agonistas de TLR4 e TLR2.

A descoberta da existência de uma família de PRRs presente no citoplasma, denominada de receptores do tipo NOD (nucleotide-binding-oligomerization domain), sugeriu que os microrganismos patogênicos que evadissem a detecção por receptores extracelulares, encontrariam uma segunda linha de reconhecimento dentro do citosol da célula do hospedeiro (Philpott et al., 2000; Inohara et al., 2005).

Os receptores tipo NOD são uma grande família de proteínas intracelulares com uma organização de três domínios que incluem: i) um domínio efetor de interação proteína-proteína do tipo CARD (caspase-activating and recruitment domain), um domínio pirina (PYD) ou um domínio BIR (repetição da IAP do baculovirus) na extremidade amino-terminal, ii) um domínio intermediário NOD (nucleotide-binding oligomerization domain), que facilita a auto-oligomerização e possui atividade ATPase e, finalmente iii) um domínio com número variável de repetições ricas em leucina (LRR:leucine-rich repeats domain) na porção carboxi-terminal, envolvido no reconhecimento do ligante (Lamkanfi e Dixit, 2009). Os receptores NOD1 e NOD2 fazem parte do subgrupo que contêm domínio efetor de interação amino-terminal CARD. Esse domínio caracteriza a diferença estrutural entre os receptores NOD1 e NOD2, sendo que o receptor NOD2 contêm dois CARDS amino-terminal, enquanto o receptor NOD1 possui um único domínio CARD (Ogura et al., 2001a) (Esquema 1).

Esquema 1. Os domínios estruturais de Nod1 e Nod2: um (para Nod1) ou dois (para Nod2) domínios amino-terminal CARD, responsáveis pela interação hemofílica com outras proteínas contendo CARD e sinal de transdução; um NBS localizado centralmente que medeia auto-oligomerização e uma LRR carboxiterminal, o domínio que reconhece o ligante. (A) Em condições de estado estacionário, proteínas Nod são reguladas negativamente pelos seus LRRs, ou seja, na ausência de estímulos, as LRRs permanecem dobradas, prevenindo a oligomerização e subsequente ativação. (B) Uma vez que o ligando é reconhecido, proteínas Nod são desdobradas, (C) permitindo auto-oligomerização e sinalização. Modificado de Carneiro et al. (2004).

Os receptores NOD1 e NOD2 foram os primeiros sensores intracelulares pertencentes à família dos NOD-like receptors (NLRs) a serem descobertos (Inohara et al., 1999; Ogura et al., 2001a). Estudos revelam a presença de 23 genes de NLRs no genoma humano e pelo menos 34 no genoma de camundongos (Harton et al., 2002; Inohara et al., 2003; Franchi et al., 2009).

Os receptores NOD1 e NOD2 estão envolvidos no reconhecimento de moléculas bacterianas produzidas pela ação das hidrolases durante a biossíntese da parede celular e remodelação e/ou após a degradação de bactérias por lisozimas do hospedeiro (Inohara et al., 2002; Meylan et al., 2006). Ambas proteínas, NOD1 e NOD2, detectam mucopeptídeos derivados de peptidoglicana. Peptidoglicana é a principal camada constituinte da parede celular de bactérias Gram-positivas, enquanto que bactérias Gram-negativas apresentam uma fina camada no espaço periplasmático. NOD1 é ativado ao reconhecer o dipeptídeo ácido, γ -D-glutamil-

meso-diaminopimélico (iE-DAP) (Chamaillard et al., 2003; Girardin et al., 2003a), o qual é constituinte de bactérias Gram-negativas e algumas Gram-positivas, como *Bacillus spp* e *Listeria monocytogenes* (Hasegawa et al., 2006). Já o receptor NOD2 reconhece porções de muramil dipeptídeo (MDP) (Girardin et al., 2003b; Inohara et al., 2003; Grimes et al., 2012), constituinte da parede celular de bactérias Gram-positivas e negativas (Meylan et al., 2006; Strober et al., 2006) (Esquema 2).

Esquema 2. Esquema demonstrando a presença de muopeptídeos iE-DAP e MDP na camada de peptidoglicana presente na parede celular de bactérias Gram- negativas e positivas. Modificado por Chen et al. (2009).

O reconhecimento de agonistas por NOD1 e NOD2 por meio das LRRs, resulta na auto oligomerização e exposição do domínio CARD, pelo recrutamento e ativação da proteína adaptadora RIP2 (Receptor-interacting protein 2), também conhecido como Ripk2 ou RICK (Inohara et al., 2005; Nembrini et al., 2009). A porção C-terminal de RIP2 contém o domínio CARD, similar ao domínio CARD dos receptores NOD1 e NOD2. A transmissão de sinais dos receptores para RIP2 é possível através da interação CARD-CARD (Park et al., 2007b). A formação do complexo NOD-RIP2 resulta na fosforilação do IKK, a qual é seguida pela translocação do fator de transcrição NFκB para o núcleo, levando a ativação de

resposta transcricional de genes inflamatórios envolvidos na imunidade inata e adaptativa. Além disso, a formação do complexo NOD-RIP2 resulta ainda na ativação da via das MAPKinases (Franchi et al., 2009). Logo, o reconhecimento de PAMPs pelos receptores NOD1 e NOD2 leva o desencadeamento do processo inflamatório pela ativação das vias NF- κ B e MAPK (Akira et al., 2006).

O esquema 3 abaixo demonstra a via de sinalização de NLRs (NOD1 e NOD2) e os eventos subjacentes à ativação por seus respectivos ligantes, γ -D-meso-glutamil-ácido diaminopimélico (iE-DAP) e muramil dipeptídeo (MDP).

Esquema 3. Modelo de reconhecimento de iE-DAP e MDP por NOD1 e NOD2. As proteínas NLRs, NOD1 e NOD2, reconhecem no citoplasma iE-DAP e MDP, respectivamente, levando ao recrutamento das proteínas adaptadoras RICK e CARD9. PAMPs extracelulares são reconhecidos pelos TLRs, que sinaliza através de MyD88, proteínas IRAK e membros TRAF. Para maior clareza, o caminho TLR foi simplificado. A subsequente ativação do NF- κ B and MAPKinases resulta na regulação positiva da transcrição de genes pró-inflamatórios. Modificado por Kanneganti et al. (2007).

Uma grande variedade de doenças inflamatórias humanas têm sido associadas com o polimorfismo dos receptores NOD1 e NOD2, incluindo: doença de Crohn (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001b), Síndrome de Blau (Miceli-Richard et al., 2001), artrite (Joosten et al., 2008; Vieira et al., 2012), eczema atópico (Weidinger et al., 2005), dermatite atópica (Macaluso et al., 2007), sarcoidose

(Kanazawa et al., 2005), asma (Hysi et al., 2005), doença inflamatória do intestino (McGovern et al., 2005), câncer de próstata (Kang et al., 2012) e câncer endometrial (Ashton et al., 2010). Esse polimorfismo também tem sido relacionado com o aumento na susceptibilidade para doenças infecciosas, como lepra (Berrington et al., 2010a) e tuberculose (Austin et al., 2008; Azad et al., 2012).

Estudos têm demonstrado o papel dos receptores NOD1 e NOD2 no controle bacteriano. Camundongos duplo deficientes para os dois receptores apresentaram uma redução significativa na produção de citocinas inflamatórias e um aumento da colonização bacteriana no tecido da mucosa em um modelo de colite com *Salmonella* (Geddes et al., 2010) e quando desafiados com *Bacillus anthracis* (Loving et al., 2009).

Há recentes relatos demonstrando que NOD1 e NOD2 estão associados com a indução da autofagia (Lu e Walsh, 2012). Autofagia é um processo de regulação imunológico, representa um mecanismo de defesa inata que pode controlar a replicação de patógenos intracelulares (Gutierrez et al., 2004; Ogawa et al., 2011). Além disso, NOD1 e NOD2 estão envolvidos no mecanismo de formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), parte essencial da resposta antimicrobiana (Tan et al., 2012).

A expressão do receptor NOD1 é detectada em uma grande variedade de tipos celulares, enquanto o receptor NOD2 é restrito em macrófagos (Ogura et al., 2001a), células dendríticas (Tada et al., 2005), queratinócitos (Voss et al., 2006), células epiteliais do intestino (Hisamatsu et al., 2003), células epiteliais do pulmão (Uehara et al., 2007a) e, também detectado em cultura primária de osteoblastos (Marriott et al., 2005), células epiteliais da cavidade oral (Uehara et al., 2008) e fibroblasto gengival de indivíduos saudáveis (Sun et al., 2010).

Estes dados levam à hipótese de que a ativação dos NLRs possa representar um importante mecanismo de reconhecimento de bactérias periodontopatogênicas invasivas, levando a produção de mediadores inflamatórios. De fato, Yamaji et al. (1995) relataram que as células do ligamento periodontal não possuem apenas a função de suporte, mas também produzem mediadores inflamatórios através da detecção de moléculas associadas aos patógenos, como LPS.

Um trabalho demonstrou que a ativação de fibroblastos gengivais humanos com MDP, um ligante específico de NOD2, leva a produção de IL-6, IL-8, CCL2, CXCL10, CXCL11 por um mecanismo dependente da ativação de MAPK e PI3K

(Hosokawa et al., 2010). Além disso, outro estudo demonstrou que a estimulação de células HEK293 transfectadas com NOD1 e NOD2 por bactérias periodontopatogênicas inativadas (*Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*) induz a ativação de NFκB e a produção de IL-8 (Okugawa et al., 2010).

Dados da literatura sugerem que o receptor NOD1 desempenha papel mais relevante no desencadeamento da resposta imune em células do ligamento periodontal quando comparado ao receptor NOD2. Jeon et al. (2012) observaram por PCR que o receptor NOD1, ao contrário do NOD2, foi constitutivamente expresso em células do ligamento periodontal comparado com a expressão de células THP-1. Após estimulação de NOD1 e NOD2 com seus respectivos agonistas, Tri-DAP e MDP, verificaram aumento da produção de IL-6 e IL-8 em células de ligamento periodontal humano. Porém, foi observada maior produção dessas citocinas ao estimular o receptor NOD1 quando comparado ao receptor NOD2.

Com base na literatura atual, sabendo que patógenos periodontais podem contribuir para ocorrência da aterosclerose, Yuan et al. (2013) testaram o papel do receptor NOD2 nas duas doenças inflamatórias crônicas, aterosclerose e periodontite. Para desenvolver o trabalho, os autores utilizaram modelo de indução de periodontite via inoculação oral com *Porphyromonas gingivalis*. Nos animais infectados duplo deficientes para o receptor NOD2 e para proteína ApoE foi observado grande infiltrado de células inflamatórias próximas ao osso alveolar, maior reabsorção óssea alveolar, maior número de osteoclastos, maior migração apical do epitélio até junção cimento esmalte e, também, aumento significativo na expressão de citocinas inflamatórias (IL-12p70, IL-1b, IL-2, IL-6, TNF-α, IL-5, IL-7, IL-17, GM-CSF) comparado aos animais deficientes somente para ApoE.

Jiao et al. (2013) avaliaram o papel do receptor NOD1 na progressão da reabsorção óssea em um modelo de periodontite induzida por ligadura. Os autores observaram que animais deficientes apresentaram uma redução da reabsorção óssea, diminuição do número de osteoclastos e recrutamento de neutrófilos comparados aos animais controles após 10 dias da inserção da ligadura. A expressão de níveis de CXCL1, IL-1β, TNF-α foi quatro vezes maior no sítio de ligadura quando comparado ao sítio controle. Porém, esses níveis foram reduzidos no sítio de ligadura de camundongos deficientes para NOD1.

Considerando que fibroblastos gengivais são as primeiras células que entram em contato com bactérias periodontopatogênicas, há um trabalho na literatura (Liu et al., 2014) que verificou aumento da expressão de receptores NOD1 e NOD2 em fibroblastos periodontais causado pela *Porphyromonas gingivalis* W83.

1.6. Receptores de reconhecimento padrão e fatores modificadores da reabsorção óssea

A integridade do tecido ósseo é mantida pelo equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea, processos que são intermediados pelos osteoblastos e osteoclastos, respectivamente. Os osteoblastos são células de origem mesenquimal cuja principal função é sintetizar componentes orgânicos da matriz óssea (colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas), participando ativamente da mineralização da matriz óssea (Aubin, 2001). Os osteoclastos, por outro lado, são células móveis e multinucleadas provenientes da linhagem mielóide da medula óssea. O processo de formação dos osteoclastos, denominado osteoclastogênese, envolve a diferenciação das células hematopoiéticas mielóides para pré-osteoclastos e, finalmente para osteoclastos maduros, os quais apresentam uma alta capacidade de reabsorção óssea (Sims e Gooi, 2008).

A osteoclastogênese e atividade dos osteoclastos são induzidas, predominantemente, por duas citocinas, o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e o ligante do receptor ativador do NFkB (RANKL). O M-CSF ao se ligar no receptor c-fms, presente nas células precursoras de osteoclastos, ativa as vias de sinalização das MAPKinases durante os estágios iniciais de diferenciação. O RANKL liga-se ao seu receptor, denominado RANK, presente na superfície de células precursoras, promovendo a ativação de vias de sinalização intracelular, como NFkB, c-Fos, fosfolipase C e fator nuclear de células T ativadas c1 (NFATc1), que são importantes para a diferenciação final dos osteoclastos (Asagiri e Takayanagi, 2007). Por outro lado, a formação e ativação dos osteoclastos podem ser limitadas por uma citocina em particular, denominada osteoprotegerina (OPG). Esta citocina se liga ao RANKL e é capaz de inibir sua interação com o receptor RANK (Simonet et al., 1997).

Acreditava-se inicialmente que as células estromais da medula, incluindo os osteoblastos, eram as únicas células efetoras capazes de induzir a diferenciação dos osteoclastos (Udagawa et al., 1990). No entanto, a identificação de que o

RANKL poderia também ser expresso por leucócitos, incluindo os linfócitos T e B, mostraram que o sistema imune também era capaz de regular a osteoclastogênese (Kawai et al., 2006). De fato, a ativação da osteoclastogênese e consequente reabsorção óssea ocorrem em patologias inflamatórias crônicas que atingem a proximidade do tecido ósseo, incluindo artrite reumatóide e periodontite. Tem sido demonstrado que citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IL-17 e TNF- α , potencializam a osteoclastogênese. Por exemplo, a IL-1 β atua sinergicamente com RANKL induzindo a maturação de osteoclastos e aumentando a sua atividade de reabsorção (Takayanagi, 2007).

A diferenciação osteogênica é identificada a partir de dois fatores Runx2 e osteocalcina. Runx2, também conhecido como Cbfa1, é um fator de transcrição para a diferenciação dos osteoblastos. O aumento de Runx2, aumenta a diferenciação e atividade dos osteoblastos (Ducy, 2000; Dong et al., 2009). Osteocalcina, importante proteína da matriz óssea, é considerada marcador da diferenciação e maturação dos osteoblastos. Quanto maior a expressão de osteocalcina, maior a quantidade de osso formado (Maimoun et al., 2011; Patterson-Buckendahl, 2011).

Tem sido mostrado que a expressão e distribuição de RANKL e OPG são diferentemente reguladas entre os diferentes graus de severidade da periodontite. A razão RANKL/OPG é maior em tecido inflamado, o qual pode ser decorrente do aumento da expressão de RANKL ou redução de OPG ou ambos. Além disso, existe uma correlação positiva entre um aumento da razão RANKL/OPG em fluido gengival de pacientes com periodontite crônica ou agressiva comparado com o observado em indivíduos saudáveis (Bostanci et al., 2007a; 2007b). Tem sido mostrado ainda maior expressão de RANKL, citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α) bem como de quimiocinas (IL-8, MCP-1, MIP-1 α) em tecidos periodontais de pacientes com gengivite ou periodontite apical crônica quando comparados ao tecido gengival saudável (Silva et al., 2008).

A expressão de RANKL e citocinas pró-osteolíticas no tecido gengival determina a evolução do processo inflamatório observado na periodontite crônica. Por outro lado, a produção de quimiocinas promove a migração de células inflamatórias e atrai células precursoras de osteoclastos para o osso alveolar. Esse conjunto de dados sugere que o padrão de citocinas produzidas em regiões mais internas do tecido gengival determinará a conversão de uma resposta fisiológica à

uma resposta patológica, com maior atividade osteoclastogênica e consequentemente maior reabsorção óssea (Graves e Cochran, 2011).

Uma quimiocina que possui grande participação no processo da reabsorção óssea é a SDF-1 α (stromal cell-derived factor-1) ou conhecida também como CXCL12. SDF-1 α age como um potente quimiotático para vários progenitores hematopoiéticos que expressam CXCR4, receptor de quimiocina para SDF-1 α . SDF-1 α /CXCR4 é um sistema de sinalização importante por regular o recrutamento de células precursoras capazes de se diferenciar em osteoclastos. Além disso, essa quimiocina é capaz de estimular a fusão celular osteoclastogênica, promover a sobrevivência dos osteoclastos e aumentar atividade de matriz metaloproteinase-9 (MMP-9) (Yu et al., 2003; Wright et al., 2005). Abe et al. (2011) detectaram alta expressão de Cxcl12 em amostras de gengiva de pacientes com periodontite crônica quando comparados com as amostras de pacientes saudáveis.

Duas enzimas que têm demonstrado desempenhar papel fundamental na degradação da matriz óssea mediada pelos osteoclastos são catepsina K e MMP-9. Tanto a catepsina K, como também, a MMP-9 são conhecidas como marcadores da atividade dos osteoclastos, pelo fato de serem derivadas principalmente dessas células (Drake et al., 1996; Fujisaki et al., 2007). Um trabalho recente relatou que a catepsina K também é expressa por fibroblastos gengivais (Beklen et al., 2014). Catepsina K contribui com a reabsorção osteoclástica ao degradar colágeno tipo I (Bossard et al., 1996), enquanto MMP-9 cliva colágeno tipo IV (Fessler et al., 1984). Considerando a diferença do substrato alvo de cada protease, a catepsina K e MMP-9 contribuem de forma distinta no processo de reabsorção óssea. De fato, Inui et al. (1999) verificaram que MMPs foram essenciais para a migração de células precursoras de osteoclastos e pré-osteoclastos para a superfície óssea a partir da matriz da membrana basal, enquanto as proteases de cisteína, como a catepsina K, contribuem para a reabsorção óssea osteoclástica.

Até o presente momento, a literatura é escassa no que se refere ao papel dos NLRs na ativação da osteoclastogênese. Um trabalho recente verificou aumento da expressão de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-11, IL-17) que favorecem a diferenciação dos osteoclastos após estimular células da polpa dental humana com MDP, agonista do receptor NOD2. Os autores também observaram que o tratamento com MDP promoveu aumento de RANKL e M-CSF e redução da expressão de OPG

(Lee et al., 2014). Além disso, sabe-se que osteoblastos expressam NOD1 e NOD2 e são capazes de reconhecer e responder a estímulos bacterianos pela ativação desses receptores (Marriot et al., 2005). A incubação de osteoblastos com LPS, IL-1 α ou TNF- α leva a expressão de RANKL, o qual é exacerbado após segunda estimulação com *Salmonella* ou MDP, um ligante de NOD2. Esse conjunto de dados sugere que os TLRs e NLRs podem atuar de forma sinérgica aumentando a expressão de RANKL em osteoblastos (Marriott et al., 2005). Por outro lado, tem sido mostrado que a ativação de NOD2 apresenta um papel alternativo, levando a uma supressão da produção de mediadores inflamatórios por estímulo bacteriano, cuja função ainda não está totalmente clara (Chauhan e Marriott, 2010).

Osteoblastos estimulados com produtos bacterianos, bem como bactérias inativadas, promoveram uma menor liberação de mediadores inflamatórios como IL-6, MCP-1, do que quando incubados com bactérias viáveis (Bost et al., 1999; 2001). Estes dados nos dão fortes indícios de que a penetração intracelular das bactérias periodontopatogênicas em osteoblastos é importante para evocar uma resposta imune e possível ativação dos receptores NOD. Além disso, as ativações dos receptores citoplasmáticos são possíveis mecanismos pelos quais as células ósseas respondem à infecção por patógenos invasivos durante uma doença osteolítica.

A habilidade das bactérias periodontopatogênicas de invadir as células do tecido periodontal e evadir aos tratamentos, constitui um fator fundamental de virulência e de resistência contra as terapias antibióticas tradicionais. A compreensão do papel dos NLRs no reconhecimento dessas bactérias invasivas pode contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos que controlam o delicado equilíbrio patógeno-hospedeiro, o qual determina tanto o estado de saúde gengival, quanto o estabelecimento e progressão da doença periodontal.

Proposição

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo geral desse estudo foi avaliar o papel dos receptores do tipo NOD (NLRs) no reconhecimento da bactéria periodontopatogênica invasiva *Porphyromonas gingivalis*, na modulação da reabsorção óssea e resposta imune em modelo de doença periodontal induzida em camundongos deficientes para os receptores NOD1 (NOD1^{-/-}) e NOD2 (NOD2^{-/-}) comparados aos animais *wild-type* (WT) por meio de:

1. análise morfométrica macroscópica e histológica da extensão da reabsorção óssea alveolar maxilar;
2. contagem do número total de bactérias presentes na cavidade bucal dos camundongos infectados;
3. quantificação de neutrófilos no tecido gengival por meio da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e avaliação da expressão gênica da quimiocina Cxcl1;
4. avaliação da produção de citocinas inflamatórias no tecido gengival por meio da técnica de ELISA;
5. avaliação da expressão gênica de fatores osteogênicos e osteoclastogênicos em tecido gengival por meio da técnica de qPCR;
6. quantificação do número de células gigantes multinucleadas (osteoclastos) na crista óssea alveolar por meio da histoenzimologia submetidos à reação da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP);
7. avaliação da expressão gênica de marcadores da atividade dos osteoclastos: catepsina K (Ctsk) e matrix metaloproteinase-9 (Mmp9).

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Processo nº 11.1.1543. 53.1, ver anexo 1).

3.1 Animais Experimentais

Para o desenvolvimento experimental foram utilizados: camundongos isogênicos machos da linhagem C57BL/6 (WT), provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Ribeirão Preto, e camundongos geneticamente deficientes para os receptores intracelulares NOD1 e NOD2 cedidos pelo Prof. Dr. Dario Simões Zamboni do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Animais machos foram utilizados para eliminar qualquer flutuação hormonal devido ao ciclo estral. Foram utilizados no mínimo 5 animais por grupo experimental, os quais permaneceram em mini-isoladoras no biotério local da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, durante o período experimental. Todos os animais apresentavam de 5-6 semanas de idade e tiveram livre acesso a água e comida durante todo o período experimental. Toda maravalha, ração e água fornecidos aos animais eram autoclavados.

3.2 Distribuição dos animais nos grupos experimentais

Os animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos: Controle e Infectado (Experimental), formando um total de 6 subgrupos de acordo com os camundongos utilizados para o estudo. Segue abaixo a divisão:

- 1) Animais WT/ Controles
- 2) Animais WT/ Infectados
- 3) Animais NOD1^{-/-}/ Controles
- 4) Animais NOD1^{-/-}/ Infectados
- 5) Animais NOD2^{-/-}/ Controles
- 6) Animais NOD2^{-/-}/ Infectados

3.3 Indução da doença periodontal experimental

3.3.1 Modelo experimental

O protocolo de indução da doença periodontal em camundongos foi realizado de acordo com o modelo previamente descrito por Sasaki et al. (2004), com algumas modificações.

Os animais receberam os antibióticos sulfametoxazol (4 mg/ml) e trimetoprima (0,8 mg/ml) na água *ad libitum* por um período de 4 dias, para suprimir a microbiota selvagem da cavidade oral, e água sem antibiótico por um período de 3 dias. Os animais foram infectados com uma inoculação oral de 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) de *Porphyromonas gingivalis* contidas em 100 µl de PBS contendo 2% de carboximetilcelulose (CMC). A carboximetilcelulose foi utilizada como veículo para que houvesse retenção das bactérias inoculadas na cavidade oral dos animais.

A inoculação foi realizada com o auxílio de uma micropipeta diretamente na cavidade oral, na região palatal próximo aos incisivos centrais. Foram realizadas 5 inoculações com intervalo de 48h entre as inoculações. Os animais controles receberam somente 100 µl de PBS contendo 2% de CMC (Esquema 4).

Primeiramente, foi realizada a padronização do modelo e determinou-se que a 4ª semana após a última inoculação bacteriana foi o melhor período para avaliar a perda óssea maxilar. Por esse motivo, as amostras foram coletadas nesse período para avaliação da reabsorção óssea alveolar e da resposta imune.

Esquema 4. Representação do protocolo experimental do modelo de doença periodontal.

3.3.2 Cultura de bactérias *Porphyromonas gingivalis*

Para a indução do modelo experimental de doença periodontal foi utilizada cepa W83 de bactérias *Porphyromonas gingivalis*, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Julio Scharfstein da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e, o procedimento de padronização e cultivo das bactérias foi realizado no laboratório do Prof. Dr. Sérgio Luiz de Souza Salvador da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

A cepa de *Porphyromonas gingivalis* W83 foi cultivada em meio Ágar-BHI, suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, 0,2% de extrato de levedura, 0,5 mg/mL de Menadiona e 1 mg/ml Hemina. Incubadas por 2 dias em jarra de anaerobiose com atmosfera de 85% N₂, 5% CO₂, 10% H₂ a 37°C. Após esse período as colônias bacterianas foram transferidas para tubos contendo caldo BHI, incubadas em anaerobiose como descrito acima por 48h a 37°C.

Considerando que a densidade ótica que determina 10⁹ UFC de *Porphyromonas gingivalis* era desconhecida, inicialmente, foi feita a padronização a partir de diferentes densidades óticas do caldo de 48h de crescimento, descrito acima, por meio do espectrofotômetro Micronal AJX 1000, a um comprimento de onda de 600nm (Marchesan et al., 2012). Foram realizadas diluições seriadas para contagem de colônias oriundas de caldos que apresentavam diferentes densidades óticas, até que se encontrasse a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) desejada para o experimento. A densidade ótica determinada para 10⁹ UFC/ml de *Porphyromonas gingivalis* foi igual a 0,7.

Foto 1. Foto do crescimento em massa da bactéria *Porphyromonas gingivalis* (W83) em meio Agar-BHI.

3.4 Quantificação do número total de bactérias orais

Para avaliar o papel dos receptores no controle das bactérias orais, no final do período experimental e anteriormente ao sacrifício dos animais, foi feita a coleta das bactérias da cavidade oral dos animais infectados utilizando-se cones de papel absorvente.

Os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina por via intramuscular e posicionados numa mesa de retração da mandíbula e maxila que permite manter a cavidade bucal aberta. Em seguida, quatro cones de papel absorvente foram inseridos na cavidade bucal dos camundongos, entre a mucosa jugal e gengiva vestibular, dois na arcada superior e dois na inferior por 5 minutos. Os cones foram armazenados em 4 ml de fluido de transporte pré redutor e vortexados. Foram feitas diluições decimais seriadas de 10^{-0} a 10^{-4} e o plaqueamento em meio Ágar-BHI. Após 5 dias de incubação em jarra de anaerobiose (atmosfera de 85% N₂, 5% CO₂, 10% H₂ a 37°C) foi realizada a contagem do número total de unidades formadoras de colônias a partir da fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de UFC} = \text{n}^{\circ} \text{ de bactérias} \times 10^x / \text{volume plaqueado (ml)},$$

onde x é o fator de diluição.

3.5 Obtenção das peças cirúrgicas

Na 4ª semana após a última inoculação bacteriana, os animais foram anestesiados por via intramuscular, com ketamina e xilazina, e a eutanásia foi realizada por sobredose administrado por via intravenosa.

O tecido gengival do palato foi removido a partir da incisão com uma lâmina de bisturi na linha mediana e distalmente aos molares, resultando em dois fragmentos de tecidos juntamente com o tecido gengival vestibular. Um fragmento foi destinado para avaliação da expressão gênica de mediadores inflamatórios e o outro para avaliação de proteínas pela técnica de ELISA e de neutrófilos pela enzima mieloperoxidase (MPO).

Para separação da maxila da calota craniana do animal, foi utilizado disco de carborundum, posicionado paralelamente a maxila, acoplado a uma caneta de baixa rotação. A hemi-maxila do lado direito foi utilizada para análise macroscópica e a do lado esquerdo para análise histológica, ambas com finalidade de observar a reabsorção da crista óssea alveolar.

3.6 Análise da reabsorção óssea alveolar

Ao término do período experimental, foi avaliada a extensão da perda óssea alveolar maxilar em peças cirúrgicas pelos métodos macroscópico e histológico.

3.6.1 Análise morfométrica macroscópica da extensão da reabsorção óssea alveolar

A extensão da reabsorção óssea alveolar foi avaliada macroscopicamente em peças cirúrgicas. Para esta análise, as hemi-arcadas das maxilas foram tratadas com peróxido de hidrogênio *overnight*, limpas e coradas com azul de metileno 1% para delinear a junção cimento-esmalte. Em seguida as peças foram fotografadas, no aumento de 2,5x utilizando uma máquina fotográfica (Canon EOS 1000D), acoplada a uma lupa de dissecação (ZEISS CL1500 ECO), de modo a ser fotografada a face palatina dos molares da hemi-maxila.

Com auxílio de um programa de análise de imagens (Image J, <http://rsb.info.nih.gov/ij>), foi realizada a medida da área da distância entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) dos primeiros molares da hemi-maxila do lado direito. O delta da reabsorção, ou seja, a quantidade óssea reabsorvida foi calculada pela diferença da média das áreas dos primeiros molares dos animais infectados pela média das áreas dos animais controles de cada grupo avaliado.

Foto 2. Foto da hemi-maxila demonstrando a delimitação da área de reabsorção óssea alveolar do 1º molar superior direito realizada pelo programa de análise de imagens Image J. A peça foi fotografada no aumento 2,5x.

3.6.2 Análise histomorfométrica da extensão da reabsorção da crista óssea alveolar e determinação do número de osteoclastos

Para quantificação de osteoclastos e extensão da perda óssea alveolar, a hemi-maxila do lado esquerdo foi destinada ao processamento histológico. Resumidamente, as hemi-maxilas esquerdas foram removidas e fixadas por imersão em formol tamponado a 10% por 24 horas à temperatura ambiente e, em seguida, lavadas *overnight* em água corrente. As peças foram descalcificadas em solução à base de EDTA a 4,13% (pH 7,4), sob agitação constante, à temperatura ambiente, trocada semanalmente até sua completa descalcificação, que ocorreu, aproximadamente, após 30 dias. O grau de descalcificação das estruturas mineralizadas foi testado por meio da penetração de uma agulha nos tecidos.

Após esse procedimento, as peças foram submetidas ao processamento histotécnico, sendo lavadas em água corrente por 2 horas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool (70% por 30 minutos; 80% por 40 minutos; 90% por 45 minutos e 95% por 50 minutos; 3 trocas de 100% por 60 minutos cada), diafanizadas em xilol (1 banho de 60 minutos e outro de 30 minutos), imersas em parafina líquida por 120 minutos e, em seguida, incluídas em parafina. Os blocos contendo as maxilas foram cortados longitudinalmente em micrótomo (Leica RM2145; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) no sentido vestibulo-palatino. Cortes seriados de 5µm foram obtidos em toda a extensão que incluía primeiro e segundo molares e a crista óssea alveolar.

Os cortes histológicos obtidos foram submetidos à reação de fosfatase ácida resistente ao tartarato – TRAP e contra-coradas com fast green. Os osteoclastos, os quais apresentaram coloração avermelhada e múltiplos núcleos, foram quantificados na crista óssea alveolar entre o primeiro e segundo molares por meio de microscópio óptico (Nikon eclipse E200). Cortes semi-seriados de cada grupo experimental também foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise histomorfométrica da reabsorção da crista óssea alveolar. A mensuração da reabsorção foi realizada pela distância entre a junção cimento-esmalte (JCE) do primeiro molar até a crista óssea alveolar (COA) pelo programa de análise de imagens (Image J).

Cortes representativos de HE e TRAP foram fotografados com câmera AxioCam MRc5 acoplada ao microscópio Axio Imager.M1(Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha).

Foto 3. Foto de corte histológico da hemi-maxila demonstrando como foi realizada a análise histomorfométrica da extensão da reabsorção da crista óssea alveolar. (Aumento de 10x), onde D (dentina); P (polpa); LP (ligamento periodontal); COA (crista óssea alveolar); JCE (junção cemento-esmalte).

3.7 Avaliação da resposta imune

3.7.1 Avaliação da expressão gênica: extração de RNA, síntese de cDNA e qPCR em tempo real

Ao término do período experimental, a expressão gênica dos mediadores inflamatórios foi determinada no tecido periodontal mole por meio de reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR).

Foram utilizados primers inventoriados para detecção de Nod1, Nod2, *TNFSF11* (codifica o mediador solúvel RANKL), *TNFSF11B* (codifica a proteína OPG), *TNFSF11A* (codifica o receptor RANK), Sdf1/ Cxcl12, Ctsk (catepsina K), Mmp9, Runx2, Osteocalcina e Cxcl1.

3.7.1.1 Processamento das amostras e extração de RNA

Foi adicionado 175 µl de tampão de lise (RNA lysis Buffer + beta-mercaptoetanol) às amostras de tecidos periodontais e, em seguida, foi realizada a trituração dos tecidos utilizando polytron (Bio Spec Products Inc, Canada, USA) em alta rotação. As etapas seguintes para a extração de RNA foram realizadas com o Kit da Promega SV Total Isolation System, de acordo com o cartão de protocolo 9FB025 indicado pelo fabricante. A integridade do RNA foi analisada, por eletroforese em gel de agarose 1%.

3.7.1.2 Síntese de cDNA

Após a extração, o RNAm obtido foi ressuspendido em água nuclease free e quantificado no aparelho nanofotômetro (NanoPhotometer® P360, Implen, Inc., California, USA). O cDNA foi sintetizado pela transcrição reversa de 1 µg de amostra de RNAm + 1 µL de Oligo DT (10mM) e H₂O q.s.p para 11 µL. A solução foi levada ao termociclador (eppendorf vapo.protect) seguindo os determinados tempos e temperaturas: 70°C por 5 minutos, 4°C por 5 minutos e 25°C por 5 minutos. A reação foi interrompida para adicionar um MIX contendo: 1 µL de DNTP (10 mM), 4 µL de Buffer 5X, 2,4 µL de MgCl₂ (25mM), 0,5 µL enzima transcriptase reversa Pre-Improm II (Promega, Madison, Wisconsin, USA) e H₂O q.s.p para 9µL. Deu-se continuidade à reação em 42°C (60 minutos), 70 °C (15 minutos) e 4°C até a remoção dos tubos do aparelho. O cDNA obtido foi diluído 5 vezes e armazenado em -20°C até o momento do uso.

3.7.1.3 qPCR em tempo real

Para as reações de qPCR, alíquotas de 2 µl de cDNA foram adicionadas a 5 µL de TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2x), 0,5 µL de TaqMan Gene Expression Assay 20x (par de primers + sonda) e acrescido de água nuclease free para um volume final de 10 µL / poço.

Primers e sondas para Nod1 (Mm00805062), Nod2 (Mm00467543), *TNFSF11* (Mm00441906), *TNFSF11B* (Mm01205928), *TNFSF11A* (Mm00437132), Sdf1/Cxcl12 (Mm00445553), Ctsk (Mm00484039), Mmp9 (Mm00442991), Runx2 (Mm00501584), Osteocalcina (Mm00649782), Cxcl1 (Mm04207460) foram obtidos comercialmente e são propriedades privadas do fornecedor (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems). O gene β-actina (Mn00607939) foi utilizado como gene endógeno.

A amplificação foi realizada em termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life Technologies Brasil Comércio e Indústria de Produtos para Biotecnologia Ltda, São Paulo, SP) sob as seguintes condições: 50°C por 2 minutos para incubação, 95°C por 20 segundos para ativação da polimerase AmpliTaq Gold Enzyme, 40 ciclos de 95°C por 1 minuto para desnaturação do DNA e 60°C por 20 segundos para o anelamento do primer e a extensão.

Os resultados foram obtidos de três experimentos independentes e analisados com base no valor do ciclo limiar (Ct, cycle threshold), sendo este o ponto correspondente ao número do ciclo obtido na fase de amplificação exponencial das amostras que permite a análise quantitativa da expressão do gene avaliado. Como controle negativo foi utilizado cDNA feito com a substituição do RNA pela água, submetida à reação com cada par das sequências dos primers e sondas utilizados.

O cálculo de expressão relativa dos genes foi normalizado pela expressão na condição controle (WT controle), ou seja, pela diferença entre ΔCt das amostras (Ct do gene alvo – Ct do gene endógeno constitutivo) e a média obtida do ΔCt dos animais WT controles, resultando os valores de $\Delta\Delta Ct$ de cada animal. Em seguida, foi realizado o cálculo da expressão de cada gene avaliado com base na equação descrita pelo trabalho de Livak e Schmittgen (2001):

$$\text{Expressão relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

3.7.2 Quantificação de citocinas pelo método de ELISA

A presença dos mediadores inflamatórios foi verificada pela técnica de ELISA, a qual determinou níveis locais de citocinas no tecido gengival do palato e vestibular. Foram utilizados pares de anticorpos de captura e detecção específicos para as citocinas inflamatórias TNF- α , IL-10 e IFN- γ .

Após a coleta das amostras, foi realizada a pesagem do tecido periodontal mole de cada animal, anteriormente à adição de PBS + inibidor de protease. Em seguida, foram trituradas em polytron (Bio Spec Products Inc, Canada, USA), imersas em nitrogênio líquido por 2 minutos para promover lise celular, trituradas novamente e, enfim, centrifugadas (10.000 rpm/10 minutos/4 °C). O sobrenadante resultante de cada amostra foi utilizado para avaliar os níveis de citocinas. A técnica de ELISA foi realizada em três etapas: 1) Captura 2) Recombinante 3) Detecção ou Anti-corpo Secundário.

Na primeira etapa foram utilizadas placas de 96 poços cobertas com 50 μL /poço do anticorpo específico contra a proteína de interesse (Pharmigen, San Diego, CA, USA.). Este anticorpo foi diluído em solução de ligação pH 9,0 e incubados *overnight*, a 4 °C.

Na segunda etapa, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS/Tween-20 (0,05% Sigma). As ligações não específicas foram bloqueadas com 200 μ L de PBS + 1% de BSA e incubadas por 60 minutos na estufa a 37° C. Em seguida, as placas foram lavadas e o padrão contendo as concentrações conhecidas para as citocinas (curva padrão do recombinante) e amostras foram pipetados nas placas (50 μ L) e incubados *overnight* a 4°C.

Na terceira etapa, as placas foram lavadas com PBS/Tween e 50 μ L dos anticorpos biotinilados (secundários) específicos contra a citocina de interesse foram adicionados. As placas foram incubadas por 120 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas com PBS/Tween e o conjugado avidina-peroxidase, na diluição de 1:200, foi pipetado 50 μ L em cada poço. Após 45 minutos de incubação em temperatura ambiente, as placas foram lavadas com PBS/Tween e 100 μ L do substrato TMB (tetramethylbenzidine) foi adicionado em cada poço das placas. As placas então foram incubadas por 15 a 20 minutos em temperatura ambiente. A reação foi acompanhada em leituras consecutivas no espectrofotômetro (Spectra Max-250, Molecular Devices) com densidade óptica de 630 nm. Os resultados foram expressos em picogramas/mg de tecido.

3.7.3 Quantificação de neutrófilos no tecido gengival

A quantificação de neutrófilos no tecido gengival palatal e vestibular foi avaliada indiretamente pela quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) por meio do ensaio colorimétrico. Ao pellet do fragmento de tecido periodontal mole foi adicionado 100 μ L de tampão contendo NaPO₄ 0,05M (ph 5,4) e 1 g H-TAB (Hexadecil Timetil Amônio Bromide), em seguida, os tubos foram agitados em vórtex por 1 min, com a finalidade de lisar e homogeneizar as amostras. Os tubos foram centrifugados (10.000 rpm/ 10 min/ 4°C) e o sobrenadante resultante foi utilizado para análise da atividade de MPO.

Resumidamente, 10 μ L de amostra a ser analisada foi misturada com 40 μ L de Tampão NaPO₄ (0,08M, pH 7,0). Foram adicionados 25 μ L de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidine) e aguardou-se 5 minutos. Em seguida foram adicionados 100 μ L de H₂O₂ 0,05mM (Peróxido de hidrogênio 30% 1:10) e aguardou-se também 5 minutos. Com finalidade de parar a reação foi adicionado a cada poço 50 μ L de H₂SO₄ - 4M. A leitura da reação foi realizada com comprimento de onda 450 nm (Spectra max).

Os resultados são apresentados como atividade de MPO (número de neutrófilos por mg de tecido).

4. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média de no mínimo 5 animais por grupo. As análises dos resultados foram realizadas pelo método de variância a um critério (One-way ANOVA), seguido de post teste de Bonferroni, de acordo com as variáveis e grupos comparados sendo que as diferenças consideradas significativas para valores de $P < 0,05$, foram determinados utilizando GraphPad Software 5.0 (Graph Pad, USA).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Expressão gênica dos receptores NOD após periodontite experimental em animais WT

A expressão gênica dos receptores NOD1 e NOD2 foi avaliada na quarta semana após a última inoculação oral com *Porphyromonas gingivalis* em amostras de tecido gengival palatal e vestibular de animais WT controles e submetidos ao modelo de indução de doença periodontal.

Como pode ser observado na figura 1, houve um aumento estatisticamente significativo da expressão de Nod1 nos animais infectados ao compará-los com os animais controles. E para a expressão gênica do receptor Nod2, observou-se uma tendência ao aumento nos animais infectados no período analisado.

Figura 1. Determinação da expressão gênica de Nod1 e Nod2. Avaliação da expressão gênica dos receptores intracelulares Nod1 e Nod2 por qPCR em amostras de tecido gengival palatal e vestibular de animais WT controles e infectados com *Porphyromonas gingivalis*. Os resultados dos genes alvos estão expressos em relação à expressão do gene endógeno β -actina. *P < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao seu respectivo grupo controle.

4.2 Controle de peso corpóreo após infecção com *Porphyromonas gingivalis*

O peso dos animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} controles e infectados foi acompanhado durante todo período experimental, com a finalidade de observar se a infecção com *Porphyromonas gingivalis* comprometeria a ingestão de ração e consequente ganho de peso desses animais. Os animais foram pesados na primeira, segunda, terceira e quarta semanas após a última inoculação bacteriana.

Os animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} infectados não apresentaram redução do peso durante o período em que foram acompanhados. Tanto o grupo controle quanto o infectado dos animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} apresentaram ganho de peso semelhante nos diferentes tempos analisados após a última inoculação bacteriana (figura 2 A, B e C). Esses dados sugerem que a infecção oral causada pela inoculação deste tipo bacteriano não comprometeu a função mastigatória dos animais, os quais apresentaram o mesmo ganho de peso que os animais controles.

Figura 2. Avaliação do peso dos animais durante o período experimental. O peso dos animais WT (A), NOD1^{-/-} (B) e NOD2^{-/-} (C) controles e infectados com *Porphyromonas gingivalis* foi acompanhado na 1, 2, 3 e 4 semanas após a última inoculação bacteriana.

4.3 Participação dos receptores intracelulares NOD1 e NOD2 na perda óssea alveolar induzida por *Porphyromonas gingivalis*

Uma vez observado aumento da expressão dos receptores intracelulares em amostras de tecido gengival de animais WT infectados com a bactéria *Porphyromonas gingivalis*, foi realizada a indução da doença periodontal em animais deficientes para esses dois receptores (NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-}) com a intenção de avaliar se a ausência desses receptores interfere na extensão da reabsorção óssea alveolar maxilar.

Os animais WT e NOD2^{-/-} infectados apresentaram maior reabsorção óssea alveolar do primeiro molar quando comparados aos seus respectivos controles ($p < 0,05$). De forma inesperada, foi observado que animais NOD1^{-/-} apresentaram maior perda óssea fisiológica que os animais WT. Neste contexto, nos animais NOD1^{-/-}, a infecção bacteriana não promoveu maior perda óssea que a fisiológica, ou seja, a área da reabsorção não foi diferente após infecção bacteriana quando comparado aos seus respectivos animais controles (figura 3).

Figura 3. Medida da área de reabsorção óssea alveolar maxilar por análise macroscópica. Reabsorção óssea alveolar maxilar do primeiro molar dos animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} controles e infectados. A extensão da reabsorção óssea alveolar foi verificada pela área entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) dos primeiros molares das hemi-maxilas dos animais controles e infectados de cada grupo experimental. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significante quando comparado ao seu respectivo grupo controle.

Com base nos achados que animais NOD1^{-/-} apresentaram maior perda óssea fisiológica, realizamos a análise comparativa de perda óssea entre cada grupo de animais. Para isso, utilizamos o delta da reabsorção óssea, ou seja, a diferença

entre a extensão da reabsorção óssea nos animais infectados e a extensão da perda óssea fisiológica. Na análise do delta da extensão da perda óssea alveolar observou-se que os animais WT apresentaram uma maior extensão da perda óssea, seguido pelos animais deficientes para NOD2 que apresentaram delta de reabsorção 1,4x menor que o WT e pelos animais deficientes para NOD1 que apresentaram delta de reabsorção 2,4x menor que o WT (figura 4 e 5).

Figura 4. Delta da área de reabsorção óssea alveolar maxilar. O delta da reabsorção óssea (Δ) ou quantidade óssea reabsorvida foi calculado pela diferença da média das áreas de reabsorção (JCE até COA) dos primeiros molares dos animais infectados pelo valor da média dos respectivos grupos de animais controles.

Figura 5. Fotos representativas da reabsorção óssea alveolar maxilar. Fotos representativas da reabsorção óssea alveolar da face palatina das hemi-maxilas dos animais WT controles (A) e infectados (B), NOD1^{-/-} controles (C) e infectados (D), NOD2^{-/-} controles (E) e infectados (F). Barra = 1mm. As peças foram fotografadas no aumento de 2,5x.

Dados macroscópicos da reabsorção óssea foram confirmados pela análise histológica. A figura 6 mostra o gráfico da medida da distância entre a junção cimento-esmalte do primeiro molar até a crista óssea alveolar em cortes das hemimaxilas dos grupos controles e infectados dos animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-}. Verificou-se que os animais WT infectados apresentaram maior reabsorção óssea alveolar, com significância estatística, quando comparados aos seus respectivos controles. Não foi observada diferença estatística entre os valores da distância JCE-COA nos animais NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} quando foi comparado o grupo controle e infectado.

Figura 6. Reabsorção da crista óssea alveolar maxilar mensurada em cortes histológicos. Distância da junção cimento-esmalte (JCE) do primeiro molar até a crista óssea alveolar (COA) de cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina dos animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} controles e infectados. *P < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao seu respectivo grupo controle.

Nos cortes histológicos dos animais infectados podemos observar crista óssea alveolar deformada e seu distanciamento da junção cimento-esmalte. Essas características foram mais evidentes e marcantes nos animais WT infectados comparados aos seus controles. Nos cortes dos animais controles, apesar de verificar uma reabsorção óssea basal, a crista apresentou-se mais íntegra e arredondada quando comparada aos animais infectados (figura 7).

Figura 7. Fotos representativas de cortes histológicos demonstrando a reabsorção da crista óssea alveolar das hemi-maxilas. Cortes histológicos representativos corados com hematoxilina e eosina das hemi-maxilas dos animais WT controles (A) e infectados (B), NOD1^{-/-} controles (C) e infectados (D), NOD2^{-/-} controles (E) e infectados (F) (Aumento de 10x), onde D (dentina); P (polpa); LP (ligamento periodontal); COA (crista óssea alveolar); JCE (junção cimento-esmalte). Barra= 100 µm.

4.4 Importância dos receptores NOD para o controle bacteriano oral

Com a finalidade de investigar o papel dos receptores NOD1 e NOD2 no controle bacteriano e possível correlação com a menor reabsorção óssea alveolar, foi realizada a contagem total de bactérias a partir de amostras da cavidade oral dos animais infectados.

Animais deficientes para o receptor NOD2 quando infectados com *Porphyromonas gingivalis* apresentaram maior UFC/ml quando comparados ao grupo WT infectado ($p < 0,05$), sugerindo que a deficiência do receptor NOD2 leva a uma debilidade na limpeza bacteriana (figura 8). Diferentemente do observado nos animais NOD2^{-/-}, não foi observada diferença de UFC/ml entre animais WT e NOD1^{-/-} infectados com *P. gingivalis*.

Figura 8. Quantificação total de bactérias orais de animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} infectados. Gráfico demonstrando a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) por volume plaqueado. A coleta das bactérias foi realizada anteriormente ao sacrifício, com cones de papel absorvente, nos animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} infectados com *Porphyromonas gingivalis*. *P < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa quando comparado aos animais WT infectados.

Com o objetivo de determinar uma possível correlação entre a presença de neutrófilos e o controle bacteriano nos tecidos periodontais de animais infectados com *Porphyromonas gingivalis*, foi avaliada a expressão gênica de Cxcl1 e presença de neutrófilo por MPO.

A expressão gênica de Cxcl1, uma quimiocina quimiotática para neutrófilos, foi avaliada por qPCR em amostras de tecido gengival palatal e vestibular de animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} controles e infectados com *Porphyromonas gingivalis*. Observou-se que os animais WT e NOD2^{-/-} infectados apresentaram maior

expressão de Cxcl1 quando comparados ao seu respectivo grupo controle, embora a diferença não seja estatisticamente significativa. A expressão de Cxcl1 em animais controles e infectados foi semelhante quando avaliados nos grupos de animais NOD1^{-/-} (figura 9).

Figura 9. Determinação da expressão gênica de Cxcl1. Avaliação da expressão gênica de Cxcl1 por qPCR em amostras de tecido gengival palatal e vestibular de animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} controles e infectados com *Porphyromonas gingivalis*. O resultado do gene alvo está expresso em relação à expressão do gene endógeno β -actina.

A quantificação de neutrófilos no tecido gengival palatal e vestibular foi avaliada indiretamente pela quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). A figura 10 demonstra que os animais deficientes para NOD1 e, principalmente, para NOD2 infectados com a bactéria, apresentaram uma tendência a uma menor quantidade de neutrófilos presentes no tecido quando comparados aos animais WT infectados.

Figura 10. Recrutamento de neutrófilos quantificados no tecido gengival. A quantificação de neutrófilos no tecido gengival dos animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} controles e infectados foi determinada pela análise da enzima mieloperoxidase (MPO).

4.5 Determinação da resposta inflamatória no local de infecção com *Porphyromonas gingivalis*

Com o intuito de avaliar a resposta inflamatória desencadeada no tecido gengival do palato e vestibular de animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} infectados com *Porphyromonas gingivalis*, foi verificada a produção de citocinas inflamatórias IFN- γ , IL-10 e TNF- α .

Foi observada menor produção, estatisticamente significativa, da citocina IFN- γ em amostras de tecido gengival de animais deficientes para o receptor NOD1 infectados quando comparados aos seus controles (figura 11).

Figura 11. Quantificação de citocina inflamatória IFN- γ no tecido gengival. Avaliação da produção de IFN- γ por ELISA em amostras de tecido gengival do palato e vestibular de animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} controles e infectados com *Porphyromonas gingivalis*. *P<0,05 indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao seu respectivo grupo controle.

Embora os níveis de IL-10 não apresentem diferença estatística entre os grupos controles e infectados, a citocina IL-10 foi encontrada em grande quantidade nos animais deficientes para NOD2 infectados quando comparados aos seus controles e aos animais WT infectados (figura 12).

Figura 12. Quantificação de citocina inflamatória IL-10 no tecido gengival. Avaliação da produção de IL-10 por ELISA em amostras de tecido gengival do palato e vestibular de animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} controles e infectados com *Porphyromonas gingivalis*.

Os animais NOD2^{-/-} infectados apresentaram menor produção de TNF- α quando comparados aos animais WT infectados com *Porphyromonas gingivalis*. A análise estatística dos dados evidenciou diferença entre os animais NOD2^{-/-} infectados e WT infectados (figura 13).

Figura 13. Quantificação de citocina inflamatória TNF- α no tecido gengival. Avaliação da produção de TNF- α por ELISA em amostras de tecido gengival do palato e vestibular de animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} controles e infectados com *Porphyromonas gingivalis*. # P < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa quando comparado aos animais WT infectados.

4.6 Avaliação de marcadores da diferenciação osteogênica em animais NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} infectados com *Porphyromonas gingivalis*

Considerando que a integridade do tecido ósseo depende da manutenção de um delicado equilíbrio entre formação óssea pelos osteoblastos e a reabsorção óssea pelos osteoclastos, foi avaliada a expressão gênica de marcadores da diferenciação osteogênica neste cenário de infecção. A expressão de Runx2 e osteocalcina foi avaliada por meio de qPCR, em amostras de tecido gengival palatal e vestibular de animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} comparando animais controles e infectados com *Phorphyromonas gingivalis*.

Embora a expressão de RNAm de Runx2 não seja estatisticamente diferente entre os grupos controles e infectados, pode-se observar uma tendência a menor expressão nos animais WT infectados quando comparado ao seu respectivo controle e maior expressão nos animais NOD2^{-/-} infectados quando comparados ao seu respectivo controle. Além disso, a expressão de RNAm de Runx2 apresentou uma

inclinação ao aumento nos animais NOD2^{-/-} infectados com a bactéria quando comparados aos animais WT infectados (figura 14A).

Com relação à expressão gênica de osteocalcina, não foi possível detectar diferença estatística entre os animais infectados e controles de nenhum grupo experimental estudado (figura 14B).

Figura 14. Determinação da expressão gênica de marcadores da diferenciação osteogênica. Avaliação da expressão gênica de Runx2 (A) e osteocalcina (B) por qPCR em amostras de tecido gengival palatal e vestibular de animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} controles e infectados com *Porphyromonas gingivalis*. Os resultados dos genes alvos estão expressos em relação à expressão do gene endógeno β-actina.

4.7 Avaliação de marcadores osteoclastogênicos em animais NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} infectados com *Porphyromonas gingivalis*

O sistema RANK/RANKL/OPG foram identificados como importantes componentes moleculares do processo de remodelação óssea. Com o objetivo de correlacionar a reabsorção óssea alveolar com a expressão gênica de marcadores da osteoclastogênese e atividade dos osteoclastos, foi realizado qPCR em amostras de tecido gengival palatal e vestibular de animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} controles e infectados com *Phorphyromonas gingivalis*.

O gene *TNFSF11*, responsável pela codificação do mediador solúvel RANKL, apresentou maior expressão nos animais WT infectados quando comparados aos seus controles ($p < 0,05$). Foi observada menor expressão gênica nos animais NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} infectados quando comparados aos animais WT infectados, porém, foi constatada diferença estatisticamente significativa somente entre animais WT e NOD2^{-/-} infectados (figura 15A).

Com relação ao gene *TNFSF11B*, que codifica a proteína OPG, os animais NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} infectados apresentaram baixa expressão gênica quando comparados aos animais WT infectados ($p < 0,05$) (figura 15B).

Sabendo os valores da expressão de RNAm dos genes que codifica RANKL e OPG, avaliou-se a razão da expressão de *TNFSF11* e *TNFSF11B*. Foi observado que o valor da razão RANKL/OPG foi maior nos animais WT infectados quando comparados aos seus respectivos controles e aos animais NOD2^{-/-} infectados ($p < 0,05$) (figura 15C).

Figura 15. Determinação da expressão gênica de marcadores osteoclastogênicos. Avaliação da expressão gênica de *TNFSF11*, que codifica a proteína RANKL, de *TNFSF11B*, que codifica a proteína OPG e da razão *TNFSF11* e *TNFSF11B* por qPCR em amostras de tecido gengival palatal e vestibular de animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} controles e infectados com *Porphyromonas gingivalis*. Os resultados dos genes alvos estão expressos em relação à expressão do gene endógeno β -actina. *P < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao seu respectivo grupo controle. # P < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa quando comparado aos animais WT infectados.

E por fim, foi avaliada a expressão gênica de dois fatores essenciais no processo de formação e atividade dos osteoclastos e recrutamento e manutenção da sobrevivência de suas células precursoras: RANK e SDF-1 α / CXCL12. O gene *TNFSF11A*, que codifica o receptor RANK, apresentou maior expressão em todos os grupos dos animais infectados quando comparados aos seus respectivos controles. Os animais WT infectados apresentaram propensão a uma maior expressão quando comparados aos animais deficientes para os receptores NOD1 e NOD2 infectados. Contudo, a análise estatística dos dados evidenciou diferença significativa entre os animais WT infectados e controles (figura 16A).

Com relação à expressão gênica de Sdf1/ Cxcl12, quimiocina que recruta células precursoras de osteoclastos, a infecção dos animais WT com *Porphyromonas gingivalis* promoveu maior expressão do gene quando comparados aos seus controles ($p < 0,05$). Animais NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} infectados apresentaram expressão significativamente menor que animais WT infectados (figura 16B).

Figura 16. Determinação da expressão gênica de *TNFSF11A* (RANK) e *Sdf1/Cxcl12*. . Avaliação da expressão gênica de *TNFSF11A*, que codifica o receptor RANK (A) e de *Sdf1/Cxcl12* (B) por qPCR em amostras de tecido gengival palatal e vestibular de animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} controles e infectados com *Porphyromonas gingivalis*. Os resultados dos genes alvos estão expressos em relação à expressão do gene endógeno β-actina. *P < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao seu respectivo grupo controle. # P < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa quando comparado aos animais WT infectados.

4.8 Avaliação da osteoclastogênese após infecção com *Porphyromonas gingivalis*

Sabendo que o recrutamento de células precursoras estava mais intenso no grupo do animais WT infectados quando comparados aos NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} infectados, cortes das hemi-maxilas foram submetidos à reação de fosfatase ácida resistente ao tartarato – TRAP e contra-coradas com fast green, com a finalidade de quantificar o número de osteoclastos na crista óssea alveolar entre o primeiro e segundo molares por meio de microscópio óptico (Nikon eclipse E200).

Apesar de verificar maior expressão gênica de fatores relacionados ao recrutamento de suas células precursoras nos animais WT infectados, observou-se, que não houve diferença no número de células Trap-positivas (osteoclastos) entre os animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} infectados (figura 17 e 18).

Figura 17. Quantificação do número de células TRAP positivas. Número de células TRAP positivas (osteoclastos) na crista óssea alveolar, entre primeiro e segundo molares, de cortes histológicos de hemi-maxilas dos animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} controles e infectados, submetidos à reação de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e contra-coradas com fast green.

Figura 18. Fotos representativas de cortes histológicos das hemi-maxilas demonstrando o osteoclasto corado com TRAP. Fotos representativas de cortes histológicos das hemi-maxilas corados por meio da técnica de histoenzimologia submetidos à reação da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), com o objetivo de identificação e contagem de células multinucleadas (osteoclastos) na crista óssea alveolar entre o primeiro e segundo molares. A: Aumento de 10x; B: Aumento de 20x; C: Aumento de 40x, onde: D (dentina); P (polpa); LP (ligamento periodontal); COA (crista óssea alveolar); JCE (junção cimento-esmalte).

4.9 Avaliação de marcadores da atividade dos osteoclastos em animais NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} infectados com *Porphyromonas gingivalis*

Considerando que não houve diferença no número de células TRAP positivas, foi avaliada a expressão gênica de duas enzimas, catepsina K e MMP-9, importantes durante o processo de degradação da matriz óssea mediada pelos osteoclastos.

Animais WT infectados com *P. gingivalis* apresentaram maior expressão gênica tanto de catepsina K (Ctsk) (Fig 19A) como de Mmp9 (Fig 19B) quando comparados aos seus controles ($p < 0,05$). Não foi detectada diferença estatística entre o grupo controle e infectado nos animais NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-}, contudo, quando foi realizada a comparação entre os grupos infectados dos diferentes animais, observou-se que a expressão desses marcadores de atividade dos osteoclastos estava menor nos animais NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-}, que o observado em animais WT ($p < 0,05$).

Figura 19. Determinação da expressão gênica de marcadores da atividade dos osteoclastos. Avaliação da expressão gênica de Ctsk e Mmp9 por qPCR em amostras de tecido gengival palatal e vestibular de animais WT, NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} controles e infectados com *Porphyromonas gingivalis*. Os resultados dos genes alvos estão expressos em relação à expressão do gene endógeno β -actina. *P < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao seu respectivo grupo controle. # P < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa quando comparado aos animais WT infectados.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Vários modelos em animal têm sido utilizados para investigar a patogênese da doença periodontal. Em nosso estudo, o modelo adotado para indução da periodontite experimental demonstrou-se efetivo, uma vez que animais WT, submetidos à inoculação oral com *Porphyromonas gingivalis* W83 apresentaram perda óssea alveolar mensurável dos primeiros molares maxilares. Diversos estudos publicados previamente na literatura utilizaram o mesmo modelo de indução (Baker et al., 1994; 1999; 2000; Lalla et al., 1998; McIntosh e Hajishengallis, 2012; Queiroz-Junior et al., 2012; Wang et al., 2013; Yoshinaka et al., 2014) e a mesma cepa de bactéria que utilizamos em nosso estudo (Sasaki et al., 2004; 2008; 2010; Miyauchi et al., 2012; Wilensky et al., 2013).

Há na literatura diversos estudos demonstrando a expressão de NOD1 e NOD2 em vários tipos celulares da cavidade oral, incluindo células do ligamento periodontal (Jeon et al., 2012), fibroblastos da polpa (Hirao et al., 2009), fibroblastos gengivais (Uehara et al., 2007b; Hosokawa et al., 2010), fibroblastos do ligamento periodontal (Tang et al., 2011) e células do epitélio gengival (Sugawara et al., 2006; Chung et al., 2010). Em nosso experimento *in vivo*, também foi demonstrado expressão gênica dos receptores NOD1 e NOD2 em tecido periodontal mole de animais WT controles. De forma semelhante ao observado por Liu et al. (2014), nós também observamos aumento significativo da expressão de NOD1, e uma tendência ao aumento da NOD2 ao infectar esses animais com *Porphyromonas gingivalis* W83.

Em nosso estudo morfométrico macroscópico e histológico da reabsorção óssea alveolar, observamos menor delta de reabsorção óssea alveolar nos animais deficientes para os receptores NOD1 e NOD2 quando comparados aos animais WT. Estudo prévio verificou que a estimulação do receptor NOD1 com seu agonista, Tri-DAP e do receptor NOD2 pelo MDP desencadeou produção de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 em células periodontais promovendo uma resposta inflamatória (Jeon et al., 2012). Portanto, em nosso experimento, os animais deficientes teriam uma inibição dessa resposta imune inflamatória, o que poderia ser responsável pela menor perda óssea.

Garlet et al. (2010) observaram aumento da perda óssea após o tratamento com inibidor da função de Treg em animais WT C57BL/6 infectados com

Actinobacillus actinomycetemcomitans. Curiosamente, observamos que os animais deficientes para o receptor NOD2 infectados apresentaram menor delta de reabsorção óssea alveolar e menor expressão de RANKL e da razão RANKL/OPG quando comparados aos animais WT infectados. De fato, Ernst et al. (2007) relataram que o aumento de RANKL em lesões ósseas alveolares parece estar associado com baixa frequência de Foxp3. Porém, essa correlação não foi observada nos animais deficientes para o receptor NOD1. Apesar de terem apresentado o menor delta de reabsorção óssea, no período analisado não foi verificada redução significativa da expressão de RANKL e da razão RANKL/OPG. O menor delta de reabsorção observado nesses animais sugere a existência de uma via alternativa de reabsorção óssea.

Há na literatura diversos trabalhos demonstrando um aumento da susceptibilidade para infecções bacterianas em camundongos deficientes para os receptores NOD1 e NOD2. No presente estudo, foi observado que os animais infectados deficientes para NOD2 apresentaram maior quantidade de bactérias orais quando comparados aos animais WT infectados. Semelhante ao nosso achado, animais deficientes para o receptor NOD2 infectados via inoculação oral com *Listeria monocytogenes* também apresentaram um aumento da carga bacteriana (Kobayashi et al., 2005; Kim et al., 2008). Apesar de não termos observado elevada carga bacteriana nos animais NOD1^{-/-} infectados quando comparados aos animais WT infectados, há trabalhos que relatam que camundongos deficientes para esse receptor também apresentaram debilitada *clearance* bacteriana (Berrington et al., 2010b). Esses dados sugerem uma atividade anti-microbiana direta do receptor NOD2 e levam à hipótese de que a elevada carga bacteriana observada nos animais NOD2^{-/-} deve-se ao não reconhecimento das bactérias periodontopatogênicas invasivas pelas células residentes como fibroblastos e células epiteliais e, consequentemente, o processo inflamatório com a intenção de combatê-las não foi desencadeado. Essa debilidade no reconhecimento das bactérias orais e no desencadeamento do processo inflamatório pode estar relacionada com a menor reabsorção óssea observada nesses animais. Porém, essa correlação não foi observada nos animais deficientes para NOD1, dado que também apresentaram menor reabsorção óssea comparado aos animais WT apesar de reduzida carga bacteriana.

Estudos da literatura têm destacado a participação dos neutrófilos na patogênese da doença periodontal (Kantarci et al., 2003; Van Dyke e Serhan, 2003). Os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa do hospedeiro, predominando nos estágios iniciais do processo inflamatório no controle bacteriano. Esse dado leva à hipótese de que a análise da expressão de Cxcl1 e a quantificação de neutrófilos presentes no tecido gengival (MPO) foi realizada em um estágio muito tardio. Desta forma, apesar de termos observado redução desses dois fatores nos animais NOD2^{-/-} infectados quando comparados aos animais WT infectados, não conseguimos detectar redução estatisticamente significativa e correlacioná-la com o aumento do número total de bactérias orais observado nos animais NOD2^{-/-} infectados.

Apesar de neutrófilos serem importantes no combate de bactérias, eles também contribuem para destruição do tecido periodontal ao liberarem MMPs e radicais livres (Madeira et al., 2012; Bondy-Carey et al., 2013). Além disso, neutrófilos tem a capacidade de interagir com osteoclastos e estimular o processo reabsortivo ósseo. Chakravarti et al. (2009) demonstraram que a expressão de RANKL é aumentada ao estimular neutrófilos murinos e humanos com ligante específico de Toll 4 (LPS) em co-culturas com osteoclastos. Dessa forma, nossos resultados permitem sugerir que o prejuízo na migração de neutrófilos para o tecido periodontal dos animais NOD1^{-/-} e, principalmente, NOD2^{-/-} infectados, observado pelo marcador enzimático mieloperoxidase (MPO) e pela baixa expressão gênica de Cxcl1, pode ter contribuído para a pequena quantidade de reabsorção óssea alveolar, ou seja, menor delta de reabsorção, além de menor expressão gênica de RANKL e Mmp9 quando comparados aos animais WT infectados. Estudos prévios também observaram uma correlação positiva da expressão de RANKL e Mmp9, dado que RANKL pode aumentar, de forma dose dependente, a quantidade de MMP-9, enquanto que inibidor de MMP-9 inibe a expressão de RANKL (Fujisaki et al., 2007; Franco et al., 2011).

Interessantemente e ao contrário do relatado por Nagahata et al. (1982), a elevada carga bacteriana observada nos animais NOD2^{-/-} infectados não estava associada com a maior severidade da doença. Esse dado corrobora com o achado no trabalho de Madeira et al. (2012) uma vez que camundongos deficientes para o fator inibitório de migração de macrófagos apresentaram redução da perda óssea alveolar, apesar do número aumentado de bactérias. Semelhantemente aos nossos

resultados, os autores também verificaram uma relação de menor extensão da reabsorção óssea alveolar com a redução do acúmulo de neutrófilos e aumento dos níveis de IL-10 no tecido periodontal dos animais deficientes. De fato, a citocina IL-10 está relacionada à baixa severidade da doença periodontal, uma vez que camundongos deficientes para essa citocina infectados com *Porphyromonas gingivalis* apresentaram severa perda óssea alveolar quando comparados aos seus controles e aos animais WT infectados (Sasaki et al., 2004). Essa relação pode ser explicada por um trabalho de Owens et al. (1996), em que os autores observaram que IL-10 é um potente inibidor da formação de osteoclastos *in vitro*. Corroborando com os achados acima e com o trabalho de Garlet et al. (2006) e Wang et al. (2013), foi verificado no presente estudo que animais NOD2^{-/-} infectados apresentaram aumento da produção de IL-10 e baixa expressão dos genes RANKL e Mmp9, associado a uma menor atividade reabsortiva alveolar comparado aos animais WT infectados. Observa-se, neste caso, que IL-10 apresenta um papel protetivo na doença periodontal ao modular ambos os sistemas RANKL e MMPs. De fato, Wilensky et al. (2013) observaram uma relação indireta dos níveis de IL-10 e quantidade de perda óssea alveolar.

A citocina TNF- α tem a capacidade de inibir a diferenciação dos osteoblastos e, conseqüentemente, prejudicar a formação óssea a partir da supressão de um fator crítico de diferenciação, Runx2 (Gilbert et al., 2000; 2002). De fato, Madeira et al. (2013) observaram menor reabsorção óssea alveolar associada a maior expressão de Runx2 e redução da produção de TNF- α em maxilas de animais deficientes para Myd88 infectados quando comparados aos animais WT infectados. Essa correlação corrobora com o encontrado em nosso estudo, dado que observamos menor perda óssea alveolar, tendência ao aumento da expressão do gene Runx2 e redução significativa da produção de TNF- α nos animais NOD2^{-/-} infectados quando comparados aos animais WT infectados.

Outro fator importante para diferenciação dos osteoblastos, a osteocalcina, apresentou elevada expressão de RNAm em culturas de células do ligamento periodontal humano tratadas com Baicalin (componente com propriedade antimicrobiana e anti-inflamatória) (Pei et al., 2014). Tendo conhecimento de que receptores tipo NLRs participam da cronificação do processo inflamatório, paralelamente ao trabalho citado anteriormente, podemos verificar que a ausência

dos receptores NOD1 e NOD2 também promoveu uma inclinação ao aumento da expressão gênica de osteocalcina. A baixa expressão de osteocalcina nos animais WT infectados, diferentemente dos animais deficientes para os receptores, pode ser explicada pela capacidade da bactéria *Porphyromonas gingivalis* de impedir a diferenciação osteoblástica ao inibir a produção de osteocalcina (Kato et al., 2014). Osteoblastos, apesar de serem responsáveis pela deposição óssea, também regulam o processo de formação e atividade dos osteoclastos. A baixa expressão de Runx2 e osteocalcina, maior expressão de RANKL e maior delta de reabsorção óssea alveolar nos animais WT infectados podem ser entendidas pelo fato de outras células, como fibroblastos gengival, neutrófilos e linfócitos T, além dos osteoblastos, expressarem RANKL (Belibasakis et al., 2005; Kawai et al., 2006; Chakravarti et al., 2009).

Além de regular a expressão de Runx2 e Osteocalcina, a citocina TNF- α também pode regular a osteoclastogênese e atividade dos osteoclastos ao influenciar na expressão de MMPs e RANKL. Camundongos deficientes para o receptor TNF- α p55 submetidos ao modelo experimental de periodontite pela infecção com *Actinobacillus actinomycetemcomitans* apresentaram uma redução significativa da perda óssea alveolar associada com redução significativa da expressão gênica de RANKL e MMPs (Garlet et al., 2007). Sabendo da participação de TNF- α na reação inflamatória, Queiroz- Junior et al. (2012) induziram periodontite em camundongos C57BL/6 e em seguida trataram os animais com anti-TNF- α . Os autores verificaram que o tratamento promoveu redução da perda óssea alveolar associada à redução da expressão de IFN- γ , TNF- α e IL-17 na maxila. Dados que corroboram com os resultados acima foram observados em nosso estudo, uma vez que verificamos maior delta de perda óssea alveolar, maior produção de TNF- α nos animais WT infectados quando comparados aos animais NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} infectados.

Recentes avanços na osteoimunologia têm identificado o papel crucial de RANKL, RANK e OPG na patogênese da doença periodontal. A atividade osteolítica é determinada pelo equilíbrio entre a expressão de RANKL e OPG. E esse balanço RANKL/OPG determina a velocidade da perda óssea alveolar e progressão da doença experimental (Garlet et al., 2006). De fato, Takahashi et al. (2013) verificaram aumento da razão RANKL/OPG após indução de periodontite

experimental por ligadura. Sabendo que fibroblastos gengivais também expressam RANKL após desafio com bactéria periodontopatogênica (Belibasakis et al., 2005), no presente estudo foi determinada a expressão gênica de RANKL em amostras de tecido gengival palatal e vestibular de animais controles e infectados com *Porphyromonas gingivalis*. Semelhante ao trabalho de Cantley et al. (2011), também foi verificada em nosso estudo correlação positiva da perda óssea e a expressão de RANKL em tecido gengival. Verificamos que os animais WT infectados apresentaram maior delta de reabsorção óssea alveolar, maior expressão significativa de RANKL e, também, da razão RANKL/OPG quando comparados aos seus controles e aos animais deficientes para NOD2. Embora os animais WT infectados tenham apresentado maior expressão de OPG quando comparados aos animais NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} infectados, foi detectada maior expressão de RANKL nesses animais e, por isso, foi observado aumento significativo da razão RANKL/OPG.

Fukada et al. (2009) encontraram altos níveis de RANKL e SDF-1 α / CXCL12 em lesões periapicais quando comparadas ao tecido gengival saudável. Em paralelo à lesão periapical, a doença periodontal também é resultante do processo inflamatório desencadeado com a intenção de combater o agente agressor e tem como seqüela a reabsorção óssea. Em nosso estudo também verificamos grande reabsorção óssea alveolar associada com aumento da expressão de RANKL, Sdf1/Cxcl12, como também de RANK em amostras de tecido gengival de animais WT infectados com *Porphyromonas gingivalis* quando comparados aos seus controles. Porém, não foi possível verificar uma correlação positiva entre a expressão de Sdf1/Cxcl12 e RANK nos animais deficientes para os receptores, dado que animais NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} infectados apresentaram baixa expressão de Sdf1/Cxcl12 e elevada de RANK.

Embora tenhamos verificado aumento da expressão do gene relacionado ao recrutamento de células precursoras de osteoclastos (Sdf1/Cxcl12) nos animais WT infectados quando comparados aos animais NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} infectados, não foi observada diferença no número de osteoclastos presentes na crista óssea alveolar entre o primeiro e segundo molares desses animais. Entretanto, sabendo que osteoclastos perdem sua função e morrem após processo reabsortivo, não podemos descartar a hipótese de que anteriormente ao período analisado, o número dessas

células poderia estar aumentado nos animais WT infectados, já que apresentaram maior reabsorção óssea alveolar.

Dados do presente estudo sugerem que a maior perda óssea macroscópica e histológica observada nos animais WT infectados quando comparados aos animais NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} infectados, deve-se à maior atividade reabsortiva dos osteoclastos verificada pela maior expressão gênica tanto de catepsina k (Ctsk), como também, de Mmp9. Reforçando nossos dados, Hie et al. (2007) verificaram que elevada expressão gênica de catepsina K resultou em um aumento da reabsorção óssea. De fato, trabalhos *in vitro* e *in vivo* sugerem que dois tipos de proteases, MMP-9 e catepsina K, estão envolvidas na reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos ao realizarem a degradação do colágeno do osso (Delaisse et al., 1987; 2003; Everts et al., 1992). Votta et al. (1997) verificaram reduzida reabsorção óssea, tanto *in vitro* como *in vivo*, ao utilizar um inibidor da catepsina K. Por outro lado, camundongos deficientes para essa enzima apresentaram significativa osteopetrose (Saftig et al., 1998; Gowen et al., 1999). Na área periodontal, níveis aumentados de catepsina K (Mogi e Otogoto, 2007; Garg et al., 2009; Leppilahti et al., 2014) e MMPs (Leppilahti et al., 2014; Toyman et al., 2014) foram encontrados no fluido gengival crevicular de pacientes com periodontite quando comparados aos pacientes saudáveis. Dessa forma, autores sugerem que a inibição da catepsina K pode ser um tratamento viável para doenças crônicas, como a doença periodontal (Stroup et al., 2001; Garg et al., 2009), e que MMPs, assim como mieloperoxidase (MPO), podem ser importantes biomarcadores da periodontite (Leppilahti et al., 2014).

O sinergismo entre receptores TLRs e NLRs provoca aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (Fritz et al., 2005; Tada et al., 2005; Park et al., 2007a). De fato, Tang et al. (2011) verificaram aumento de proteínas importantes na atividade dos osteoclastos, IL-1 β , IL-6 e IL-8, após estimulação de fibroblastos do ligamento periodontal humano com Pam3C5K4 (agonista de TLR2) e LPS (agonista de TLR4) associado à iE-DAP (agonista de NOD1) e MDP (agonista de NOD2). Kim et al. (2008) também verificaram aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF- α , ao co-estimular macrófagos com MDP e LPS quando comparado à resposta observada somente com o estímulo de LPS. Do mesmo modo, Chamaillard et al. (2003) demonstrou que iE-DAP, ligante específico de NOD1, age sinergicamente com LPS promovendo a produção de IL-6 após estimular

macrófagos de camundongos WT. No presente estudo, a menor atividade dos osteoclastos detectada pela menor expressão de Ctsk e Mmp9 observada nos animais NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} também pode ser explicada pela menor produção de TNF- α após inoculação de *Porphyromonas gingivalis*.

Com base nos nossos resultados, observamos que, apesar de requererem a mesma proteína adaptadora, a estimulação específica de NOD1 e NOD2 levou a respostas distintas em relação a alguns mediadores inflamatórios. A diferença no grau de reabsorção óssea observada entre os animais NOD1^{-/-} e NOD2^{-/-} pode ser compreendida pelo fato da bactéria *Porphyromonas gingivalis* W83 exercer papel estimulatório distinto entre os dois receptores, como demonstrado em um trabalho de Okugawa et al. (2010) e, como consequência, foi verificado menor delta de perda óssea alveolar nos animais NOD1^{-/-} quando comparados aos animais WT.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Independente das variáveis observadas, verificamos que os receptores NOD1 e NOD2 contribuem para a progressão da reabsorção óssea alveolar em modelo experimental de periodontite. Esses dados nos dão indícios de uma possível inibição dos receptores intracelulares como potenciais alvos terapêuticos no controle e prevenção da reabsorção óssea na doença periodontal.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe D, Kubota T, Morozumi T, Shimizu T, Nakasone N, Itagaki M, et al. Altered gene expression in leukocyte transendothelial migration and cell communication pathways in periodontitis-affected gingival tissues. *Journal of periodontal research*. 2011;46(3):345-53.

Akira S. TLR signaling. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006;311:1-16.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.

Ammann TW, Belibasakis GN, Thurnheer T. Impact of early colonizers on in vitro subgingival biofilm formation. *PloS one*. 2013;8(12):e83090.

Andrian E, Grenier D, Rouabhia M. In vitro models of tissue penetration and destruction by *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and immunity*. 2004;72(8):4689-98.

Archer KA, Ader F, Kobayashi KS, Flavell RA, Roy CR. Cooperation between multiple microbial pattern recognition systems is important for host protection against the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Infection and immunity*. 2010;78(6):2477-87.

Arron JR, Choi Y. Bone versus immune system. *Nature*. 2000;408(6812):535-6.

Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*. 2007;40(2):251-64.

Ashton KA, Proietto A, Otton G, Symonds I, McEvoy M, Attia J, et al. Toll-like receptor (TLR) and nucleosome-binding oligomerization domain (NOD) gene polymorphisms and endometrial cancer risk. *BMC cancer*. 2010;10:382.

Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2001;2(1):81-94.

Austin CM, Ma X, Graviss EA. Common nonsynonymous polymorphisms in the NOD2 gene are associated with resistance or susceptibility to tuberculosis disease in African Americans. *The Journal of infectious diseases*. 2008;197(12):1713-6.

Azad AK, Sadee W, Schlesinger LS. Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. *Infection and immunity*. 2012;80(10):3343-59.

Baker PJ, Evans RT, Roopenian DC. Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and induced alveolar bone loss in immunocompetent and severe combined immunodeficient mice. *Archives of oral biology*. 1994;39(12):1035-40.

Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC. CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infection and immunity*. 1999;67(6):2804-9.

Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2000;2(10):1181-92.

Baker PJ, Dixon M, Roopenian DC. Genetic control of susceptibility to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in mice. *Infection and immunity*. 2000;68(10):5864-8.

Bartold PM, Marshall RI, Haynes DR. Periodontitis and rheumatoid arthritis: a review. *Journal of periodontology*. 2005;76(11 Suppl):2066-74.

Beck JD, Offenbacher S. Systemic effects of periodontitis: epidemiology of periodontal disease and cardiovascular disease. *Journal of periodontology*. 2005;76(11 Suppl):2089-100.

Beklen A, Hukkanen M, Richardson R, Konttinen YT. Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 1-10 in periodontitis. *Oral microbiology and immunology*. 2008;23(5):425-31.

Beklen A, Al-Samadi A, Konttinen Y. Expression of cathepsin K in periodontitis and in gingival fibroblasts. *Oral diseases*. 2014.

Belibasakis GN, Johansson A, Wang Y, Chen C, Kalfas S, Lerner UH. The cytolethal distending toxin induces receptor activator of NF-kappaB ligand expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *Infection and immunity*. 2005;73(1):342-51.

Berrington WR, Macdonald M, Khadge S, Sapkota BR, Janer M, Hagge DA, et al. Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. *The Journal of infectious diseases*. 2010a;201(9):1422-35.

Berrington WR, Iyer R, Wells RD, Smith KD, Skerrett SJ, Hawn TR. NOD1 and NOD2 regulation of pulmonary innate immunity to *Legionella pneumophila*. *European journal of immunology*. 2010b;40(12):3519-27.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441(7090):235-8.

Bjelland S, Bray P, Gupta N, Hirscht R. Dentists, diabetes and periodontitis. *Australian dental journal*. 2002;47(3):202-7; quiz 72.

Bondy-Carey JL, Galicia J, Bagaitkar J, Potempa JS, Potempa B, Kinane DF, et al. Neutrophils alter epithelial response to *Porphyromonas gingivalis* in a gingival crevice model. *Molecular oral microbiology*. 2013;28(2):102-13.

Bossard MJ, Tomaszek TA, Thompson SK, Amegadzie BY, Hanning CR, Jones C, et al. Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(21):12517-24.

Bost KL, Ramp WK, Nicholson NC, Bento JL, Marriott I, Hudson MC. Staphylococcus aureus infection of mouse or human osteoblasts induces high levels of interleukin-6 and interleukin-12 production. *The Journal of infectious diseases*. 1999;180(6):1912-20.

Bost KL, Bento JL, Petty CC, Schrum LW, Hudson MC, Marriott I. Monocyte chemoattractant protein-1 expression by osteoblasts following infection with Staphylococcus aureus or Salmonella. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2001;21(5):297-304.

Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Toz H, et al. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *Journal of clinical periodontology*. 2007a;34(5):370-6.

Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Toz H, et al. Differential expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin mRNA in periodontal diseases. *Journal of periodontal research*. 2007b;42(4):287-93.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO BÁSICA. Projeto SBBrazil 2010: pesquisa nacional de saúde bucal - resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde, 92 p., 2011.

Burns E, Bachrach G, Shapira L, Nussbaum G. Cutting Edge: TLR2 is required for the innate response to *Porphyromonas gingivalis*: activation leads to bacterial persistence and TLR2 deficiency attenuates induced alveolar bone resorption. *J Immunol*. 2006;177(12):8296-300.

Cantley MD, Haynes DR, Marino V, Bartold PM. Pre-existing periodontitis exacerbates experimental arthritis in a mouse model. *Journal of clinical periodontology*. 2011;38(6):532-41.

Carneiro LA, Travassos LH, Philpott DJ. Innate immune recognition of microbes through Nod1 and Nod2: implications for disease. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2004;6(6):609-16.

Chakravarti A, Raquil MA, Tessier P, Poubelle PE. Surface RANKL of Toll-like receptor 4-stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. *Blood*. 2009;114(8):1633-44.

Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nature immunology*. 2003;4(7):702-7.

Chauhan VS, Marriott I. Differential roles for NOD2 in osteoblast inflammatory immune responses to bacterial pathogens of bone tissue. *Journal of medical microbiology*. 2010;59(Pt 7):755-62.

Chen G, Shaw MH, Kim YG, Nunez G. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annual review of pathology*. 2009;4:365-98.

Chung WO, An JY, Yin L, Hacker BM, Rohani MG, Dommisch H, et al. Interplay of protease-activated receptors and NOD pattern recognition receptors in epithelial innate immune responses to bacteria. *Immunology letters*. 2010;131(2):113-9.

Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, Ribeiro CP, Narciso LG, de Lima VM, et al. Apical periodontitis and periodontal disease increase serum IL-17 levels in normoglycemic and diabetic rats. *Clinical oral investigations*. 2014.

Cutler CW, Jotwani R. Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontology 2000*. 2004;35:135-57.

de Molon RS, de Avila ED, Cirelli JA. Host responses induced by different animal models of periodontal disease: a literature review. *Journal of investigative and clinical dentistry*. 2012.

de Molon RS, de Avila ED, Nogueira AV, de Souza JA, Avila-Campos MJ, de Andrade CR, et al. Evaluation of the Host Response in Various Models of Induced Periodontal Disease in Mice. *Journal of periodontology*. 2013; 85(3):465-77.

de Pablo P, Chapple ILC, Buckley CD, Dietrich T. Periodontitis in systemic rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2009;5(4):218-24.

Delaisse JM, Boyde A, Maconnachie E, Ali NN, Sear CH, Eeckhout Y, et al. The effects of inhibitors of cysteine-proteinases and collagenase on the resorptive activity of isolated osteoclasts. *Bone*. 1987;8(5):305-13.

Delaisse JM, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc Res Tech*. 2003;61(6):504-13.

Dong SW, Ying DJ, Duan XJ, Xie Z, Yu ZJ, Zhu CH, et al. Bone regeneration using an acellular extracellular matrix and bone marrow mesenchymal stem cells expressing Cbfa1. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2009;73(10):2226-33.

Drake FH, Dodds RA, James IE, Connor JR, Debouck C, Richardson S, et al. Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(21):12511-6.

Ducy P. Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2000;219(4):461-71.

Ebersole JL, Steffen MJ, Thomas MV, Al-Sabbagh M. Smoking-related cotinine levels and host responses in chronic periodontitis. *Journal of periodontal research*. 2013.

Ernst CW, Lee JE, Nakanishi T, Karimbux NY, Rezende TM, Stashenko P, 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(2):271-80.

Everts V, Delaisse JM, Korper W, Niehof A, Vaes G, Beertsen W. Degradation of collagen in the bone-resorbing compartment underlying the osteoclast involves both cysteine-proteinases and matrix metalloproteinases. *J Cell Physiol*. 1992;150(2):221-31.

Fessler LI, Duncan KG, Fessler JH, Salo T, Tryggvason K. Characterization of the procollagen IV cleavage products produced by a specific tumor collagenase. *The Journal of biological chemistry*. 1984;259(15):9783-9.

Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nature immunology*. 2005;6(4):331-7.

Franchi L, Warner N, Viani K, Nunez G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunological reviews*. 2009;227(1):106-28.

Franco GC, Kajiya M, Nakanishi T, Ohta K, Rosalen PL, Groppo FC, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 activity by doxycycline ameliorates RANK ligand-induced osteoclast differentiation in vitro and in vivo. *Experimental cell research*. 2011;317(10):1454-64.

Frandsen EV, Poulsen K, Curtis MA, Kilian M. Evidence of recombination in *Porphyromonas gingivalis* and random distribution of putative virulence markers. *Infection and immunity*. 2001;69(7):4479-85.

Fritz JH, Girardin SE, Fitting C, Werts C, Mengin-Lecreulx D, Caroff M, et al. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *European journal of immunology*. 2005;35(8):2459-70.

Fujisaki K, Tanabe N, Suzuki N, Kawato T, Takeichi O, Tsuzukibashi O, et al. Receptor activator of NF-kappaB ligand induces the expression of carbonic anhydrase II, cathepsin K, and matrix metalloproteinase-9 in osteoclast precursor RAW264.7 cells. *Life sciences*. 2007;80(14):1311-8.

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(1):25-31.

Gaffen SL, Hajishengallis G. A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *Journal of dental research*. 2008;87(9):817-28.

Garg G, Pradeep AR, Thorat MK. Effect of nonsurgical periodontal therapy on crevicular fluid levels of Cathepsin K in periodontitis. *Archives of oral biology*. 2009;54(11):1046-51.

Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral microbiology and immunology*. 2006;21(1):12-20.

Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clinical and experimental immunology*. 2007;147(1):128-38.

Garlet GP, Cardoso CR, Mariano FS, Claudino M, de Assis GF, Campanelli AP, et al. Regulatory T cells attenuate experimental periodontitis progression in mice. *Journal of clinical periodontology*. 2010;37(7):591-600.

Geddes K, Rubino S, Streutker C, Cho JH, Magalhaes JG, Le Bourhis L, et al. Nod1 and Nod2 regulation of inflammation in the Salmonella colitis model. *Infection and immunity*. 2010;78(12):5107-15.

Gelani V, Fernandes AP, Gasparoto TH, Garlet TP, Cestari TM, Lima HR, et al. The role of toll-like receptor 2 in the recognition of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Journal of periodontology*. 2009;80(12):2010-9.

Genco CA, Van Dyke T, Amar S. Animal models for *Porphyromonas gingivalis*-mediated periodontal disease. *Trends in microbiology*. 1998;6(11):444-9.

Gilbert L, He X, Farmer P, Boden S, Kozlowski M, Rubin J, et al. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology*. 2000;141(11):3956-64.

Gilbert L, He X, Farmer P, Rubin J, Drissi H, van Wijnen AJ, et al. Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(4):2695-701.

Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*. 2003a;300(5625):1584-7.

Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *The Journal of biological chemistry*. 2003b;278(11):8869-72.

Gowen M, Lazner F, Dodds R, Kapadia R, Feild J, Tavaría M, et al. Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1999;14(10):1654-63.

Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *Journal of periodontology*. 2008;79(8 Suppl):1585-91.

Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *Journal of periodontology*. 2003;74(3):391-401.

Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *Journal of clinical periodontology*. 2008;35(2):89-105.

Graves DT, Li J, Cochran DL. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *Journal of dental research*. 2011;90(2):143-53.

Grimes CL, Ariyananda Lde Z, Melnyk JE, O'Shea EK. The innate immune protein Nod2 binds directly to MDP, a bacterial cell wall fragment. *Journal of the American Chemical Society*. 2012;134(33):13535-7.

Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *Journal of periodontology*. 1994;65(3):260-7.

Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell*. 2004;119(6):753-66.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 1994;5:78-111.

Hajishengallis G. Immune evasion strategies of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of oral biosciences / JAOB, Japanese Association for Oral Biology*. 2011;53(3):233-40.

Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *Journal of periodontology*. 2000;71(10):1554-60.

Harton JA, Linhoff MW, Zhang J, Ting JP. Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. *J Immunol*. 2002;169(8):4088-93.

Hasegawa M, Yang K, Hashimoto M, Park JH, Kim YG, Fujimoto Y, et al. Differential release and distribution of Nod1 and Nod2 immunostimulatory molecules among bacterial species and environments. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(39):29054-63.

Hatakeyama J, Tamai R, Sugiyama A, Akashi S, Sugawara S, Takada H. Contrasting responses of human gingival and periodontal ligament fibroblasts to bacterial cell-surface components through the CD14/Toll-like receptor system. *Oral microbiology and immunology*. 2003;18(1):14-23.

Hie M, Shimono M, Fujii K, Tsukamoto I. Increased cathepsin K and tartrate-resistant acid phosphatase expression in bone of streptozotocin-induced diabetic rats. *Bone*. 2007;41(6):1045-50.

Hirao K, Yumoto H, Takahashi K, Mukai K, Nakanishi T, Matsuo T. Roles of TLR2, TLR4, NOD2, and NOD1 in pulp fibroblasts. *Journal of dental research*. 2009;88(8):762-7.

Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2003;124(4):993-1000.

Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology 2000*. 1999;20:168-238.

Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Amanuma R, Yamazaki K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. *Clinical and experimental immunology*. 2006;144(1):35-40.

Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H, Matsuo T. CC chemokine ligand 17 in periodontal diseases: expression in diseased tissues and production by human gingival fibroblasts. *Journal of periodontal research*. 2008;43(4):471-7.

Hosokawa I, Hosokawa Y, Ozaki K, Yumoto H, Nakae H, Matsuo T. Proinflammatory effects of muramyl dipeptide on human gingival fibroblasts. *Journal of periodontal research*. 2010;45(2):193-9.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6837):599-603.

Hysi P, Kabesch M, Moffatt MF, Schedel M, Carr D, Zhang Y, et al. NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma. *Human molecular genetics*. 2005;14(7):935-41.

Inohara, Chamaillard, McDonald C, Nunez G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annual review of biochemistry*. 2005;74:355-83.

Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, et al. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(21):14560-7.

Inohara N, Ogura Y, Nunez G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Current opinion in microbiology*. 2002;5(1):76-80.

- Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(8):5509-12.
- Inui T, Ishibashi O, Origane Y, Fujimori K, Kokubo T, Nakajima M. Matrix metalloproteinases and lysosomal cysteine proteases in osteoclasts contribute to bone resorption through distinct modes of action. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;258(1):173-8.
- Jeffcoat MK, Geurs NC, Reddy MS, Cliver SP, Goldenberg RL, Hauth JC. Periodontal infection and preterm birth: results of a prospective study. *J Am Dent Assoc*. 2001;132(7):875-80.
- Jeon DI, Park SR, Ahn MY, Ahn SG, Park JH, Yoon JH. NOD1 and NOD2 stimulation triggers innate immune responses of human periodontal ligament cells. *International journal of molecular medicine*. 2012;29(4):699-703.
- Jiao Y, Darzi Y, Tawaratsumida K, Marchesan JT, Hasegawa M, Moon H, et al. Induction of bone loss by pathobiont-mediated Nod1 signaling in the oral cavity. *Cell host & microbe*. 2013;13(5):595-601.
- Joosten LA, Heinhuis B, Abdollahi-Roodsaz S, Ferwerda G, Lebourhis L, Philpott DJ, et al. Differential function of the NACHT-LRR (NLR) members Nod1 and Nod2 in arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(26):9017-22.
- Kanazawa N, Okafuji I, Kambe N, Nishikomori R, Nakata-Hizume M, Nagai S, et al. Early-onset sarcoidosis and CARD15 mutations with constitutive nuclear factor-kappaB activation: common genetic etiology with Blau syndrome. *Blood*. 2005;105(3):1195-7.
- Kang MJ, Heo SK, Song EJ, Kim DJ, Han SY, Han JH, et al. Activation of Nod1 and Nod2 induces innate immune responses of prostate epithelial cells. *Prostate*. 2012;72(12):1351-8.
- Kanneganti TD, Lamkanfi M, Nunez G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*. 2007;27(4):549-59.
- Kantarci A, Oyaizu K, Van Dyke TE. Neutrophil-mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis: findings from localized aggressive periodontitis. *Journal of periodontology*. 2003;74(1):66-75.
- Kato H, Taguchi Y, Tominaga K, Umeda M, Tanaka A. *Porphyromonas gingivalis* LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells. *Archives of oral biology*. 2014;59(2):167-75.
- Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *The American journal of pathology*. 2006;169(3):987-98.

Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International immunology*. 2009;21(4):317-37.

Kesavalu L, Sathishkumar S, Bakthavatchalu V, Matthews C, Dawson D, Steffen M, et al. Rat model of polymicrobial infection, immunity, and alveolar bone resorption in periodontal disease. *Infection and immunity*. 2007;75(4):1704-12.

Kim YC, Ko Y, Hong SD, Kim KY, Lee YH, Chae C, et al. Presence of *Porphyromonas gingivalis* and plasma cell dominance in gingival tissues with periodontitis. *Oral diseases*. 2010;16(4):375-81.

Kim YG, Park JH, Shaw MH, Franchi L, Inohara N, Nunez G. The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to Toll-like receptor ligands. *Immunity*. 2008;28(2):246-57.

Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nunez G, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*. 2005;307(5710):731-4.

Kolenbrander PE, Palmer RJ, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8(7):471-80.

Kornman KS. Mapping the Pathogenesis of Periodontitis: A New Look. *Journal of periodontology*. 2008;79(8):1560-8.

Kusumoto Y, Hirano H, Saitoh K, Yamada S, Takedachi M, Nozaki T, et al. Human gingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 after stimulation with *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptor 2. *Journal of periodontology*. 2004;75(3):370-9.

Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Schmidt AM. A murine model of accelerated periodontal disease in diabetes. *Journal of periodontal research*. 1998;33(7):387-99.

Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunological reviews*. 2009;227(1):95-105.

Lee SI, Kim GT, Kim HJ, Park SH, Kim EC. NOD2 Mediates Odontoblast Differentiation and RANKL Expression. *Journal of dental research*. 2014.

Leon R, Silva N, Ovalle A, Chaparro A, Ahumada A, Gajardo M, et al. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in the amniotic fluid in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor. *Journal of periodontology*. 2007;78(7):1249-55.

Leppilahti JM, Hernandez-Rios PA, Gamonal JA, Tervahartiala T, Brignardello-Petersen R, Mantyla P, et al. Matrix metalloproteinases and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid provide site-specific diagnostic value for chronic periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2014;41(4):348-56.

- Lima HR, Gelani V, Fernandes AP, Gasparoto TH, Torres SA, Santos CF, et al. The essential role of toll like receptor-4 in the control of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. Journal of clinical periodontology. 2010;37(3):248-54.
- Liu J, Duan J, Wang Y, Ouyang X. Intracellular adhesion molecule-1 is regulated by *porphyromonas gingivalis* through nucleotide binding oligomerization domain-containing proteins 1 and 2 molecules in periodontal fibroblasts. Journal of periodontology. 2014;85(2):358-68.
- Liu KZ, Duarte PM, Santos VR, Xiang X, Xu M, Miranda TS, et al. Assessment of Tissue Oxygenation of Periodontal Inflammation in Smokers using Optical Spectroscopy. Journal of clinical periodontology. 2014; 41(4):340-7.
- Liu YC, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. Periodontology 2000. 2010;52(1):163-206.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25(4):402-8.
- Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental Gingivitis in Man. Journal of periodontology. 1965;36:177-87.
- Loving CL, Osorio M, Kim YG, Nunez G, Hughes MA, Merkel TJ. Nod1/Nod2-mediated recognition plays a critical role in induction of adaptive immunity to anthrax after aerosol exposure. Infection and immunity. 2009;77(10):4529-37.
- Lu JV, Walsh CM. Programmed necrosis and autophagy in immune function. Immunological reviews. 2012;249(1):205-17.
- Lu Q, Darveau RP, Samaranayake LP, Wang CY, Jin L. Differential modulation of human {beta}-defensins expression in human gingival epithelia by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide with tetra- and penta-acylated lipid A structures. Innate immunity. 2009;15(6):325-35.
- Macaluso F, Nothnagel M, Parwez Q, Petrasch-Parwez E, Bechara FG, Epplen JT, et al. Polymorphisms in NACHT-LRR (NLR) genes in atopic dermatitis. Experimental dermatology. 2007;16(8):692-8.
- Madeira MF, Queiroz-Junior CM, Costa GM, Santos PC, Silveira EM, Garlet GP, et al. MIF induces osteoclast differentiation and contributes to progression of periodontal disease in mice. Microbes and infection / Institut Pasteur. 2012;14(2):198-206.
- Madeira MF, Queiroz-Junior CM, Cisalpino D, Werneck SM, Kikuchi H, Fujise O, et al. MyD88 is essential for alveolar bone loss induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide in mice. Molecular oral microbiology. 2013;28(6):415-24.

Mahanonda R, Sa-Ard-Iam N, Montreekachon P, Pimkhaokham A, Yongvanichit K, Fukuda MM, et al. IL-8 and IDO expression by human gingival fibroblasts via TLRs. *J Immunol.* 2007;178(2):1151-7.

Maimoun L, Fattal C, Sultan C. Bone remodeling and calcium homeostasis in patients with spinal cord injury: a review. *Metabolism: clinical and experimental.* 2011;60(12):1655-63.

Marchesan JT, Morelli T, Lundy SK, Jiao Y, Lim S, Inohara N, et al. Divergence of the systemic immune response following oral infection with distinct strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Molecular oral microbiology.* 2012;27(6):483-95.

Marriott I, Rati DM, McCall SH, Tranguch SL. Induction of Nod1 and Nod2 intracellular pattern recognition receptors in murine osteoblasts following bacterial challenge. *Infection and immunity.* 2005;73(5):2967-73.

McGovern DP, Hysi P, Ahmad T, van Heel DA, Moffatt MF, Carey A, et al. Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Human molecular genetics.* 2005;14(10):1245-50.

McIntosh ML, Hajishengallis G. Inhibition of *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontal bone loss by CXCR4 antagonist treatment. *Molecular oral microbiology.* 2012;27(6):449-57.

Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature.* 2006;442(7098):39-44.

Miceli-Richard C, Lesage S, Rybojad M, Prieur AM, Manouvrier-Hanu S, Hafner R, et al. CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat Genet.* 2001;29(1):19-20.

Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *Journal of periodontology.* 2000;71(11):1699-707.

Miyauchi S, Maekawa T, Aoki Y, Miyazawa H, Tabeta K, Nakajima T, et al. Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and systemic cytokine profile in C57BL/6.KOR-ApoE sh1 mice. *Journal of periodontal research.* 2012;47(3):402-8.

Mogi M, Ootogoto J. Expression of cathepsin-K in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *Archives of oral biology.* 2007;52(9):894-8.

Mombelli A. Periodontitis as an infectious disease: specific features and their implications. *Oral diseases.* 2003;9 Suppl 1:6-10.

Mori Y, Yoshimura A, Ukai T, Lien E, Espevik T, Hara Y. Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis. *Oral microbiology and immunology.* 2003;18(1):54-8.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986;136(7):2348-57.

Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nature reviews Immunology.* 2002;2(12):933-44.

Nagahata T, Kiyoshige T, Tomono S, Abe R, Sasaki S, Takazoe I. Oral implantation of *Bacteroides asaccharolyticus* and *Eikenella corrodens* in conventional hamsters. *Infection and immunity.* 1982;36(1):304-9.

Neiders ME, Chen PB, Suido H, Reynolds HS, Zambon JJ, Shlossman M, et al. Heterogeneity of virulence among strains of *Bacteroides gingivalis*. *Journal of periodontal research.* 1989;24(3):192-8.

Nembrini C, Kisielow J, Shamshiev AT, Tortola L, Coyle AJ, Kopf M, et al. The kinase activity of Rip2 determines its stability and consequently Nod1- and Nod2-mediated immune responses. *The Journal of biological chemistry.* 2009;284(29):19183-8.

Ng SK, Leung WK. A community study of periodontal attachment loss in smokers. *International dental journal.* 2008a;58(5):243-6.

Ng SK, Leung WK. A community study on the relationship of dental anxiety with oral health status and oral health-related quality of life. *Community dentistry and oral epidemiology.* 2008b;36(4):347-56.

Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *Journal of periodontology.* 1996;67(10 Suppl):1103-13.

Offenbacher S, Barros SP, Beck JD. Rethinking Periodontal Inflammation. *Journal of periodontology.* 2008;79(8):1577-84.

Ogawa M, Yoshikawa Y, Mimuro H, Hain T, Chakraborty T, Sasakawa C. Autophagy targeting of *Listeria monocytogenes* and the bacterial countermeasure. *Autophagy.* 2011;7(3):310-4.

Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *The Journal of biological chemistry.* 2001a;276(7):4812-8.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 2001b;411(6837):603-6.

Okugawa T, Kaneko T, Yoshimura A, Silverman N, Hara Y. NOD1 and NOD2 mediate sensing of periodontal pathogens. *Journal of dental research.* 2010;89(2):186-91.

Owens JM, Gallagher AC, Chambers TJ. IL-10 modulates formation of osteoclasts in murine hemopoietic cultures. *J Immunol.* 1996;157(2):936-40.

Ozmeric N, Preus NR, Olsen I. Genetic diversity of *Porphyromonas gingivalis* and its possible importance to pathogenicity. *Acta odontologica Scandinavica.* 2000;58(4):183-7.

Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology 2000.* 1997;14:216-48.

Palmer RJ, Jr. Supragingival and subgingival plaque: paradigm of biofilms. *The Compendium of continuing education in dentistry.* 2010;31(2):104-6, 8, 10 passim; quiz 24, 38.

Park JH, Kim YG, Shaw M, Kanneganti TD, Fujimoto Y, Fukase K, et al. Nod1/RICK and TLR signaling regulate chemokine and antimicrobial innate immune responses in mesothelial cells. *J Immunol.* 2007a;179(1):514-21.

Park JH, Kim YG, McDonald C, Kanneganti TD, Hasegawa M, Body-Malapel M, et al. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J Immunol.* 2007b;178(4):2380-6.

Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC. Host immune responses to *Porphyromonas gingivalis* antigens. *Periodontology 2000.* 2010;52(1):218-37.

Patterson-Buckendahl P. Osteocalcin is a stress-responsive neuropeptide. *Endocrine regulations.* 2011;45(2):99-110.

Pei Z, Wang B, Zhang F, Niu Z, Shi S, Cannon RD, et al. Response of Human Periodontal Ligament Cells to Baicalin. *Journal of periodontology.* 2014.

Perioli L, Ambrogi V, Rubini D, Giovagnoli S, Ricci M, Blasi P, et al. Novel mucoadhesive buccal formulation containing metronidazole for the treatment of periodontal disease. *J Control Release.* 2004;95(3):521-33.

Petersen PE, Ogawa H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *Journal of periodontology.* 2005;76(12):2187-93.

Philpott DJ, Yamaoka S, Israel A, Sansonetti PJ. Invasive *Shigella flexneri* activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J Immunol.* 2000;165(2):903-14.

Polak D, Wilensky A, Shapira L, Halabi A, Goldstein D, Weiss EI, et al. Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/*Fusobacterium nucleatum* infection: bone loss and host response. *Journal of clinical periodontology.* 2009;36(5):406-10.

Popescu MR, Nitu M, Dragomir L, Olteanu M, Olteanu M. Histological changes of gingival epithelium in diabetic patients with periodontal disease. *Romanian journal of*

morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie. 2013;54(4):1093-6.

Queiroz-Junior CM, Madeira MF, Coelho FM, de Oliveira CR, Candido LC, Garlet GP, et al. Experimental arthritis exacerbates *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced periodontitis in mice. Journal of clinical periodontology. 2012;39(7):608-16.

Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, et al. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998;95(23):13453-8.

Sasaki H, Okamatsu Y, Kawai T, Kent R, Taubman M, Stashenko P. The interleukin-10 knockout mouse is highly susceptible to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss. Journal of periodontal research. 2004;39(6):432-41.

Sasaki H, Suzuki N, Kent R, Jr., Kawashima N, Takeda J, Stashenko P. T cell response mediated by myeloid cell-derived IL-12 is responsible for *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis in IL-10-deficient mice. J Immunol. 2008;180(9):6193-8.

Sasaki H, Suzuki N, Alshwaimi E, Xu Y, Battaglini R, Morse L, et al. 18beta-glycyrrhetic acid inhibits periodontitis via glucocorticoid-independent nuclear factor-kappaB inactivation in interleukin-10-deficient mice. Journal of periodontal research. 2010;45(6):757-63.

Schenkein HA, Fletcher HM, Bodnar M, Macrina FL. Increased opsonization of a prtH-defective mutant of *Porphyromonas gingivalis* W83 is caused by reduced degradation of complement-derived opsonins. J Immunol. 1995;154(10):5331-7.

Silva N, Dutzan N, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Aguillon JC, et al. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. Journal of clinical periodontology. 2008;35(3):206-14.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell. 1997;89(2):309-19.

Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. Seminars in cell & developmental biology. 2008;19(5):444-51.

Slade GD, Offenbacher S, Beck JD, Heiss G, Pankow JS. Acute-phase inflammatory response to periodontal disease in the US population. Journal of dental research. 2000;79(1):49-57.

Slots J, Genco RJ. Black-pigmented *Bacteroides species*, *Capnocytophaga species*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence

factors in colonization, survival, and tissue destruction. Journal of dental research. 1984;63(3):412-21.

Slots J. Bacterial Specificity in Adult Periodontitis - a Summary of Recent Work. Journal of clinical periodontology. 1986;13(10):912-7.

Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. Journal of periodontology. 1992;63(4 Suppl):322-31.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. Journal of clinical periodontology. 1998;25(2):134-44.

Sojar HT, Sharma A, Genco RJ. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae bind to cytokeratin of epithelial cells. Infection and immunity. 2002;70(1):96-101.

Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. Nature reviews Immunology. 2006;6(1):9-20.

Stroup GB, Lark MW, Veber DF, Bhattacharyya A, Blake S, Dare LC, et al. Potent and selective inhibition of human cathepsin K leads to inhibition of bone resorption in vivo in a nonhuman primate. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2001;16(10):1739-46.

Sugawara Y, Uehara A, Fujimoto Y, Kusumoto S, Fukase K, Shibata K, et al. Toll-like receptors, NOD1, and NOD2 in oral epithelial cells. Journal of dental research. 2006;85(6):524-9.

Sun Y, Shu R, Li CL, Zhang MZ. Gram-negative periodontal bacteria induce the activation of Toll-like receptors 2 and 4, and cytokine production in human periodontal ligament cells. Journal of periodontology. 2010;81(10):1488-96.

Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. Cell. 2000;100(6):655-69.

Tada H, Aiba S, Shibata K, Ohteki T, Takada H. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. Infection and immunity. 2005;73(12):7967-76.

Takahashi S, Fukuda M, Mitani A, Fujimura T, Iwamura Y, Sato S, et al. Follicular dendritic cell-secreted protein is decreased in experimental periodontitis concurrently with the increase of interleukin-17 expression and the Rankl/Opg mRNA ratio. Journal of periodontal research. 2013; 49(3):390-7.

Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. Nature reviews Immunology. 2007;7(4):292-304.

Tal M. Periodontal disease and oral hygiene. Described by Antoni van Leeuwenhoek. Journal of periodontology. 1980;51(11):668-9.

- Tan X, Li WW, Guo J, Zhou JY. Down-regulation of NOD1 in neutrophils of periparturient dairy cows. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2012;150(1-2):133-9.
- Tang L, Zhou XD, Wang Q, Zhang L, Wang Y, Li XY, et al. Expression of TRAF6 and pro-inflammatory cytokines through activation of TLR2, TLR4, NOD1, and NOD2 in human periodontal ligament fibroblasts. *Archives of oral biology*. 2011;56(10):1064-72.
- Teng YT, Mahamed D, Singh B. Gamma interferon positively modulates *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-specific RANKL+ CD4+ Th-cell-mediated alveolar bone destruction in vivo. *Infection and immunity*. 2005;73(6):3453-61.
- Theodoro LH, Caiado RC, Longo M, Novaes VC, Zanini NA, Ervolino E, et al. Effectiveness of the diode laser in the treatment of ligature-induced periodontitis in rats: a histopathological, histometric, and immunohistochemical study. *Lasers in medical science*. 2014.
- Toyman U, Tuter G, Kurtis B, Kivrak E, Bozkurt S, Yucel AA, et al. Evaluation of gingival crevicular fluid levels of tissue plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor 2, matrix metalloproteinase-3 and interleukin 1-beta in patients with different periodontal diseases. *Journal of periodontal research*. 2014.
- Tribble GD, Lamont RJ. Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue. *Periodontology 2000*. 2010;52(1):68-83.
- Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, et al. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(18):7260-4.
- Uehara A, Fujimoto Y, Fukase K, Takada H. Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Molecular immunology*. 2007a;44(12):3100-11.
- Uehara A, Takada H. Functional TLRs and NODs in human gingival fibroblasts. *Journal of dental research*. 2007b;86(3):249-54.
- Uehara A, Imamura T, Potempa J, Travis J, Takada H. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* synergistically induce the production of proinflammatory cytokines through protease-activated receptors with Toll-like receptor and NOD1/2 ligands in human monocytic cells. *Cellular microbiology*. 2008;10(5):1181-9.
- Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *Journal of dental research*. 2003;82(2):82-90.
- Vieira SM, Cunha TM, Franca RF, Pinto LG, Talbot J, Turato WM, et al. Joint NOD2/RIPK2 signaling regulates IL-17 axis and contributes to the development of experimental arthritis. *J Immunol*. 2012;188(10):5116-22.

Voss E, Wehkamp J, Wehkamp K, Stange EF, Schroder JM, Harder J. NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(4):2005-11.

Votta BJ, Levy MA, Badger A, Bradbeer J, Dodds RA, James IE, et al. Peptide aldehyde inhibitors of cathepsin K inhibit bone resorption both in vitro and in vivo. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1997;12(9):1396-406.

Wang L, Wang J, Jin Y, Gao H, Lin X. Oral Administration of All-Trans Retinoic Acid Suppresses Experimental Periodontitis by Modulating the Th17/Treg Imbalance. *Journal of periodontology*. 2013; 85(5):740-50.

Wara-aswapati N, Chayasadom A, Surarit R, Pitiphat W, Boch JA, Nagasawa T, et al. Induction of toll-like receptor expression by *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of periodontology*. 2013;84(7):1010-8.

Weaver CT, Hatton RD. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(12):883-9.

Weidinger S, Klopp N, Rummeler L, Wagenpfeil S, Novak N, Baurecht HJ, et al. Association of NOD1 polymorphisms with atopic eczema and related phenotypes. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;116(1):177-84.

Wilensky A, Polak D, Hourii-Haddad Y, Shapira L. The role of RgpA in the pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis* in the murine periodontitis model. *Journal of clinical periodontology*. 2013;40(10):924-32.

Wright LM, Maloney W, Yu X, Kindle L, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Stromal cell-derived factor-1 binding to its chemokine receptor CXCR4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment, development and survival of human osteoclasts. *Bone*. 2005;36(5):840-53.

Yamaji Y, Kubota T, Sasaguri K, Sato S, Suzuki Y, Kumada H, et al. Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. *Infection and immunity*. 1995;63(9):3576-81.

Yang HW, Huang YF, Chou MY. Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontally diseased and healthy subjects. *Journal of periodontology*. 2004;75(8):1077-83.

Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity*. 2008;28(1):29-39.

Yoshinaka K, Shoji N, Nishioka T, Sugawara Y, Hoshino T, Sugawara S, et al. Increased interleukin-18 in the gingival tissues evokes chronic periodontitis after bacterial infection. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2014;232(3):215-22.

Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2003;18(8):1404-18.

Yuan H, Zelka S, Burkatovskaya M, Gupte R, Leeman SE, Amar S. Pivotal role of NOD2 in inflammatory processes affecting atherosclerosis and periodontal bone loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(52):E5059-68.

Zhang X, Teng YT. Interleukin-10 inhibits gram-negative-microbe-specific human receptor activator of NF-kappaB ligand-positive CD4+-Th1-cell-associated alveolar bone loss in vivo. *Infection and immunity*. 2006;74(8):4927-31.

Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 1997;89(4):587-96.

Zhu M, Belkina AC, Defuria J, Carr JD, Van Dyke TE, Gyurko R, et al. B cells promote obesity-associated periodontitis and oral pathogen-associated inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 2014.

Anexo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.1543.53.1), intitulado "Papel dos Receptores tipo NOD na Modulação da Osteoclastogênese e Reabsorção Óssea Durante Periodontite Experimental", de autoria de **Sandra Yasuyo Fukada Alves**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 01/02/2012.

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.1543.53.1), entitled: "Papel dos Receptores tipo NOD na Modulação da Osteoclastogênese e Reabsorção Óssea Durante Periodontite Experimental", by **Sandra Yasuyo Fukada Alves**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, February 01, 2012.

Ribeirão Preto, 10 de fevereiro de 2012.

Presidente da CEUA
Profª Drª Claudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro