

CATARINA MEDEIROS ROCHA

Efeito da infecção experimental por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Streptococcus gordonii* sobre a expressão de genes associados à barreira intestinal e inflamação, níveis séricos de LPS e reabsorção do osso alveolar em modelo murino.

São Paulo

2022

CATARINA MEDEIROS ROCHA

Efeito da infecção experimental por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Streptococcus gordonii* sobre a expressão de genes associados à barreira intestinal e inflamação, níveis séricos de LPS e reabsorção do osso alveolar em modelo murino

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, para obter o título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Periodontia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Saraiva

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcia Pinto Alves Mayer

São Paulo

2022

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Rocha, Catarina Medeiros.

Efeito da infecção experimental por *A. actinomycetemcomitans* e *S. gordonii* sobre a expressão de genes associados a barreira intestinal e inflamação, níveis séricos de LPS e reabsorção do osso alveolar em modelo murino/ Catarina Medeiros Rocha; orientadora Luciana Saraiva. -- São Paulo, 2022.

96 p. : fig.; tab.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de concentração: Periodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Periodontite experimental. 2. *A. actinomycetemcomitans*. 3. Perda óssea alveolar. 4. Intestino. 5. Expressão gênica I. Saraiva, Luciana. II. Título.

Rocha CM. Efeito da infecção experimental por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Streptococcus gordonii* sobre a expressão de genes associados à barreira intestinal e inflamação, níveis séricos de LPS e reabsorção do osso alveolar em modelo murino. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 05 / 08 /2022

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Bruno Bueno Silva

Instituição: Universidade de Guarulhos Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Ericka Tavares Pinheiro

Instituição: Universidade de São Paulo Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Cristina Cunha Villar

Instituição: Universidade de São Paulo Julgamento: Aprovada

AGRADECIMENTOS

Muito difícil escrever esse texto, pois a gratidão que tenho pela pesquisa científica e todas as pessoas envolvidas é enorme. Agradeço ao conhecimento compartilhado e pelo crescimento pessoal que essa fase me ofereceu. Aprendi com as melhores pessoas como amar a ciência e como ela é tão importante, principalmente nos dias de hoje.

Gostaria de agradecer a minha orientadora, Luciana Saraiva, por acreditar em mim e no meu trabalho, mesmo quando eu mesma não acreditava. Agradeço pelas portas que me foram abertas e por me inspirar tanto. A maneira como ela cuida de seus pacientes é exemplar.

À minha co-orientadora, Marcia Pinto Alves Mayer, dirijo a minha mais profunda gratidão. Trabalhar com ela é um privilégio. E a sua inteligência e carinho são algo que me impressionam em todas as nossas trocas. Obrigada por tanto conhecimento repassado e por tantas palavras de incentivo, elas foram essenciais. Lhe guardo no coração.

À exemplar pesquisadora Ellen Sayuri, agradeço por ter me ensinado tudo que sei e mais um pouco. Não tenho como colocar em palavras em como a sua ajuda foi essencial. A sua doçura e inteligência foram muito importantes para enfrentar todas as dificuldades que me foram apresentadas durante essa pesquisa.

À Dione Kawamoto, que desde o primeiro momento me acolheu e me ajudou a trilhar esse caminho da pesquisa com muito mais facilidade e maestria. O seu profissionalismo e o seu método de trabalho me ensinam e me tornam uma pesquisadora melhor.

Aos meus amigos de laboratório, Fernando Martins, Aline Carlucci e Manuela Rocha. Trabalhar com vocês é um privilégio e o nosso companheirismo foi imprescindível para chegar até aqui. Sem o apoio de vocês, não estaria escrevendo essas palavras.

Às companheiras de trabalho Bruna Eduarda de Oliveira e Karin Ishikawa, agradeço a colaboração fundamental à conclusão deste trabalho.

Ao departamento e aos professores do programa de pós-graduação em Periodontia, em especial ao Prof. Dr. Cláudio Mendes Pannuti, agradeço o suporte e contribuições científicas.

Às amigas que a FOUSP me deu, Mônica Misawa, Bruna DiProfio, Marília Cabral e Bruno França, obrigada por terem segurado a minha mão e me mostrarem que é possível amar a ciência mesmo com todas as dificuldades.

Sou muito grata, principalmente aos meus pais, Sérgio e Nazaré Rocha. O amor de vocês é o motivo de estar aqui hoje. Agradeço por sempre terem priorizado minha educação e por todos os sacrifícios que permearam esse caminho. Vocês são os melhores pais que alguém poderia ter. Às minhas irmãs, Caroline e Larissa, agradeço a maior amizade que conhecerei em vida. O apoio e carinho de vocês aquece o meu coração. Aos meus cunhados, Daniel Frasson e Eduardo Aguiar, vocês tornam a vida muito mais prazerosa. Aos meus sobrinhos, Guilherme e Benjamin Frasson, amo vocês com todo o meu coração. Aos meus amigos de infância, Camilla Bueno, Carolina Garcia e Victoria Leal, agradeço a parceria sempre presente e sincera.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esta dissertação fosse realizada e concluída, os meus mais sinceros agradecimentos.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processos 2015/18273-9 e 2018/02318-1).

RESUMO

Rocha CM. Efeito da infecção experimental por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Streptococcus gordonii* sobre a expressão de genes associados à barreira intestinal e inflamação, níveis séricos de LPS e reabsorção do osso alveolar em modelo murino. [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

Periodontite é uma doença inflamatória, induzida por uma microbiota disbiótica, que tem sido associada a uma série de condições sistêmicas, como diabetes e doenças cardiovasculares. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* é o patógeno mais associado à previamente chamada “periodontite agressiva”, hoje denominada periodontite padrão incisivo-molar. Apesar do conhecimento sobre vários de seus fatores de virulência relacionados à colonização da cavidade oral e a evasão das defesas do hospedeiro, os efeitos da infecção oral por *A. actinomycetemcomitans* e suas repercussões sistêmicas ainda são pouco compreendidos. Existem evidências de que a periodontite é caracterizada não apenas pela disbiose da microbiota oralmas também do intestino. No entanto, o impacto da infecção por *A.actinomycetemcomitans* sobre a microbiota residente do intestino e sobre a integridade da barreira intestinal ainda não foi investigado. Estudos *in vitro* e dados obtidos em humanos sugerem que a associação de *A.actinomycetemcomitans* (Aa) com *Streptococcus gordonii* (Sg) apresenta efeito sinérgico na indução da perda óssea alveolar. Assim, esta proposta visou avaliar o efeito da administração oral de um consórcio microbiano formado por *A. actinomycetemcomitans* e *S. gordonii* na indução de perda óssea alveolar em modelo murino e suas repercussões sobre o intestino, avaliando a microbiota intestinal, a expressão de genes associados à barreira intestinal e ao perfil inflamatório e os níveis séricos de LPS. Camundongos C57/Bl6 foram alocados em 4 grupos: controle negativo não infectado (SHAM), infectado com *S. gordonii* LD1(Sg), infectado com *A. actinomycetemcomitans* JP2 (Aa) e infectado com ambos os organismos (Sg+Aa). De acordo com o grupo experimental, os animais receberam inoculação oral de Sg e/ou Aa (1×10^8 UFC/dose) 3 vezes por semana, e injeção no palato de Aa (1×10^7 UFC) semanalmente, por 4 semanas. Controles recebendo somente os veículos das bactérias foram

empregados. Após 30 dias, os animais foram sacrificados, e determinada a colonização oral e do intestino por *A. actinomycetemcomitans* e a razão Firmicutes/Bacteroidetes por qPCR; a perda óssea alveolar, por microCT; a expressão de genes associados à inflamação e à permeabilidade do epitélio no intestino por RT-qPCR; e os níveis séricos de LPS pelo ensaio de Limulus.

RESULTADOS: Não houve diferença no ganho de peso entre os grupos experimentais. Foi detectada maior perda alveolar, determinada pelos dados de volume ósseo e porosidade óssea nos animais dos grupos infectados em relação ao SHAM, não havendo diferença entre os grupos de animais infectados (Aa, Sg ou Aa+Sg). Não houve diferença significativa nos níveis séricos de LPS entre os grupos, embora tenha sido indicada tendência a maior nível sérico de LPS nos animais dos grupos infectados com Aa e Sg+Aa (não significativa). Aa não foi detectado em amostras de biofilme gengival ou do conteúdo intestinal. Foi realizado o ratio de Firmicutes/ Bacteroidetes nas amostras de conteúdo intestinal e não teve diferença estatística entre os grupos. A infecção alterou a expressão relativa de *Il-10* no intestino, com regulação positiva nos animais do grupo Aa. A expressão de *Il1 β* no intestino foi maior no grupo Aa do que nos demais grupos, embora esta diferença não tenha sido significativa. A infecção também promoveu alterações na expressão de proteínas associadas à barreira intestinal. A administração de *A. actinomycetemcomitans* induziu regulação positiva na transcrição de *Cldn1* e *Ocln*, que codificam as proteínas de *tigh junction* claudina 1 e ocludina, e em *Zo1* que codifica a proteína de ancoragem zonulina 1. O grupo administrado com *S. gordonii* também apresentou regulação positiva de *Cldn1* e *Ocln*, embora em menor grau que o grupo Aa. No entanto, a administração do consórcio não induziu a alteração na transcrição destes genes em relação ao controle não infectado. Assim, considerando as limitações do estudo e a necessidade de investigações posteriores, os dados obtidos indicam que o uso de *Streptococcus gordonii* poderia potencializar a colonização e virulência do *A. actinomycetemcomitans*.

Palavras-chaves: Periodontite experimental. *A. actinomycetemcomitans*. *Streptococcus gordonii*. Perda óssea alveolar. Intestino. Expressão gênica. Tight junctions.

ABSTRACT

Rocha CM. Association of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Streptococcus gordonii* for induction of experimental periodontitis in mice [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida

Periodontitis is an inflammatory disease, induced by a dysbiotic microbiota, which has been associated with a number of systemic conditions such as diabetes and cardiovascular disease. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is the pathogen most associated with the previously called "aggressive periodontitis", now called standard incisor-molar periodontitis. Despite the knowledge about several of its virulence factors related to colonization of the oral cavity and evasion of host defenses, the effects of oral infection by *A. actinomycetemcomitans* and its systemic repercussions are still poorly understood. There is evidence that periodontitis is characterized not only by dysbiosis of the oral microbiota but also of the gut. However, the impact of *A. actinomycetemcomitans* infection on the resident microbiota of the gut and on the integrity of the intestinal barrier has not yet been investigated. In vitro studies and human data suggest that the association of *A. actinomycetemcomitans* (Aa) with *Streptococcus gordonii* (Sg) has a synergistic effect in inducing alveolar bone loss. Thus, this proposal aimed to evaluate the effect of oral administration of a microbial consortium formed by *A. actinomycetemcomitans* and *S. gordonii* in the induction of alveolar bone loss in a murine model and its repercussions on the intestine, evaluating the intestinal microbiota, the expression of genes associated with the intestinal barrier and inflammatory profile and serum levels of LPS. C57/Bl6 mice were allocated into 4 groups: uninfected negative control (SHAM), infected with *S. gordonii* LD1(Sg), infected with *A. actinomycetemcomitans* JP2 (Aa) and infected with both organisms (Sg+Aa). According to the experimental group, animals received oral inoculation of Sg and/or Aa (1×10^8 UFC/dose) 3 times a week, and palate injection of Aa (1×10^7 UFC) weekly for 4 weeks. Controls receiving only the bacteria vehicles were employed. After 30 days, the animals were sacrificed, and the oral and intestinal colonization by *A. actinomycetemcomitans* and the Firmicutes/Bacteroidetes ratio were determined by qPCR; alveolar bone loss, by

microCT; the expression of genes associated with inflammation and epithelial permeability in the intestine by RT-qPCR; and serum LPS levels by Limulus assay. RESULTS: There was no difference in weight gain between the experimental groups. Greater alveolar loss, as determined by bone volume and bone porosity data, was detected in animals from the infected groups compared to SHAM, with no difference between the groups of infected animals (*A. actinomycetemcomitans*, Sg, or *A. actinomycetemcomitans* +Sg). There was no significant difference in serum LPS levels between the groups, although a trend towards higher serum LPS levels was indicated in animals from the Aa and Sg+Aa infected groups (not significant). *A. actinomycetemcomitans* was not detected in gingival biofilm or intestinal content samples. Firmicutes/ Bacteroidetes ratio was performed on the gut content samples and had no statistical difference between the groups. Infection altered the relative expression of *Il-10* in the intestine, with positive regulation in the animals of the *A. actinomycetemcomitans* group. The expression of *Il-1 β* in the intestine was higher in group Aa than in the other groups, although this difference was not significant. The infection also promoted changes in the expression of proteins associated with the intestinal barrier. Administration of *A. actinomycetemcomitans* induced positive regulation in the transcription of *Cldn1* and *Ocln*, which encode the tight junction proteins claudin 1 and occludin, and in *Zo1* which encodes the anchoring protein zonulin 1. The group administered with *S. gordonii* also showed positive regulation of *Cldn1* and *Ocln*, although to a lesser degree than the *A. actinomycetemcomitans* group. However, administration of the consortium did not induce a change in the transcription of these genes compared to the uninfected control. Thus, considering the study and the need for further research, the data obtained indicate that the use of *Streptococcus gordonii* can potentiate the colonization of *A. actinomycetemcomitans*.

Keywords: Periodontitis. *A. actinomycetemcomitans*. *Streptococcus gordonii*. Alveolar bone loss. Intestine. Gene expression. Tight junction.

LISTA DE SIGLAS

Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Sg	<i>Streptococcus gordonii</i>
Cldn1	Claudina 1
Ocln	Ocludina
LPS	Lipopolissacarídeo
Zo1	Zonulina 1
qPCR	PCR quantitativo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DO	Densidade Ótica
MicroCT	Microtomografia computadorizada
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
<i>DspB</i>	Dispersina B
<i>MMP</i>	Metaloproteínas da matriz
PGE	Prostaglandina E2
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
O-PS	Polissacarídeo O
TLR	Toll Like Receptor
DCs	Células dendríticas
IFN-γ	Interferon-γ
LDL	Lipoproteína de baixa densidade.
TJ	Tight Junctions
<i>UFC</i>	<i>Unidade Formadora de Colônias</i>
IBD	Doença inflamatória crônica do intestino

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 3.1 - Delineamento do ensaio de periodontite experimental. 3 vezes por semana, durante 4 semanas os animais foram inoculados por via oral com 1×10^8 UFC/mL de *A. actinomycetemcomitans* e/ou *S. gordonii* ressuspenso em gel de carboximetilcelulose em PBS. Os grupos inoculados com *A. actinomycetemcomitans* também receberam injeção de 1×10^7 UFC/mL de *A. actinomycetemcomitans* suspenso em PBS no palato esquerdo. Dia 30: após jejum de 5h, os animais foram sacrificados31
- Figura 4.1 - Níveis de LPS em Unidades de Endotoxina (EU) por ml de soro, determinado pelo ensaio de Limulus, em) de camundongos C57BL/6 após o período experimental de 30 dias dos seguintes grupos: SHAM (controle negativo não infectado), Aa (com administração de *A. actinomycetemcomitans* via oral e por injeções palatinas), Sg (com administração de *S. gordonii* via oral) e Aa + Sg (com administração de *S. gordonii* via oral e administração de *A. actinomycetemcomitans* via oral e por injeções palatinas). ANOVA com pós teste de Tukey $p > 0,05\%$ 42
- Figura 4.2 - Ganho de peso (em gramas) de camundongos C57BL/6 após o período experimental de 30 dias dos seguintes grupos: SHAM (controle negativo não infectado), Aa (com administração de *A. actinomycetemcomitans* via oral e por injeções palatinas), Sg (com administração de *S. gordonii* via oral) e Aa + Sg (com administração de *S. gordonii* via oral e administração de *A. actinomycetemcomitans* via oral e por injeções palatinas)44
- Figura 4.3 - Expressão genica relativa de *Il-10* (A) e *Il-1 β* (B), expressa em número de vezes em relação ao controle negativo (SHAM), determinada por RT-qPCR em intestino de camundongos C57BL/6 após o período experimental de 30 dias dos seguintes grupos: SHAM (controle negativo não infectado), Aa (com administração de *A. actinomycetemcomitans* via oral e por injeções palatinas), Sg (com administração de *S. gordonii* via oral) e Aa + Sg (com administração de *S. gordonii* via oral e administração de *A. actinomycetemcomitans* via oral e por injeções palatinas). ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, *** $p < 0,05\%$ 46

- Figura 4.4 - Expressão gênica relativa de *Cldn 1* (A), *Ocln* (B) e *Zo1* (C), expressa em número de vezes em relação ao controle negativo (SHAM), determinada por RT-qPCR em intestino de camundongos C57BL/6 após o período experimental de 30 dias dos seguintes grupos: SHAM (controle negativo não infectado), Aa (com administração de *A. atinomycescomitans* via oral e por injeções palatinas), Sg (com administração de *S. gordonii* via oral) e Aa + Sg (com administração de *S. gordonii* via oral e administração de *A. atinomycescomitans* via oral e por injeções palatinas). ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, * p <0,05%..... 48
- Figura 4.5 - Proporção Firmicutes/Bacteroidetes do conteúdo intestinal dos grupos SHAM (controle negativo não infectado), Aa (com administração de *A. atinomycescomitans* via oral e por injeções palatinas), Sg (com administração de *S. gordonii* via oral) e Aa + Sg (com administração de *S. gordonii* via oral e administração de *A. atinomycescomitans* via oral e por injeções palatinas). ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, * p <0,05%. Determinada por RT-qPCR em intestino de camundongos C57BL/6 após o período experimental de 30 dias 50
- Figura 4.6 - Dados médios e desvio padrão de volume ósseo (pixels³) (em A) e porosidade óssea (pixels³) (em B) da região interproximal entre o primeiro e o segundo molar (área de 60 x 30 pixels³, corte coronal) da hemimaxila direita de camundongos C57BL/6 após o período experimental de 30 dias dos seguintes grupos: SHAM (controle negativo não infectado), Aa (com administração de *A. atinomycescomitans* via oral e por injeções palatinas), Sg (com administração de *S. gordonii* via oral) e Aa + Sg (com administração de *S. gordonii* via oral e administração de *A. atinomycescomitans* via oral e por injeções palatinas). ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, *p <0,05%..... 52

LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1- Referência das sequências de sondas/primers Taqman utilizadas para cada gene alvo cuja expressão foi avaliada por RT-qPCR 36
- Tabela 3.2- Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-qPCR 37
- Tabela 3.3- Sequência dos iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR da Proporção firmicutes/Bacteroidetes..... 39
- Tabela 5.1- Níveis de bactérias totais no biofilme (média e desvio padrão) de camundongos C57BL/6 após o período experimental de 30 dias dos seguintes grupos: SHAM (controle negativo não infectado), Aa (com administração de *A. atinomycetemcomitans* via oral e por injeções palatinas), Sg (com administração de *S. gordonii* via oral) e Aa + Sg (com administração de *S. gordonii* via oral e administração de *A. atinomycetemcomitans* via oral e por injeções palatinas) 43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	PROPOSIÇÃO	27
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	29
3.2	ANIMAIS E CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO	29
3.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	30
3.4	CEPAS UTILIZADAS	31
3.5	INOCULAÇÕES DE MICRORGANISMOS	32
3.6	EUTANÁSIA E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	34
3.7	NÍVEIS DE LPS EM SORO	34
3.8	ESTUDO DA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À INFLAMAÇÃO E À PERMEABILIDADE DA BARREIRA EPITELIAL (RT-QPCR)	35
3.9	ANÁLISE EM PCR EM TEMPO REAL DOS NÍVEIS DE <i>A. Atinomycetemcomitans</i> EM AMOSTRAS DE CONTEÚDO INTESTINAL E BIOFILME ORAL	37
3.10	ANÁLISE EM PCR EM TEMPO REAL DA PROPORÇÃO FIRMICUTES/BACTEROIDETES DO BIOFILME	38
3.11	MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA (MicroCT)	39
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4	RESULTADOS	41
4.1	LIOFILIZAÇÃO DO CONSÓRCIO MICROBIANO	41
4.2	NÍVEIS DE LPS NO SORO	41
4.3	ANÁLISE EM PCR EM TEMPO REAL DOS NÍVEIS DE <i>A. ATINOMYCETEMCOMITANS</i> EM AMOSTRAS DE CONTEÚDO INTESTINAL E BIOFILME ORAL	42

4.4	EFEITOS COLATERAIS E GANHO DE PESO INDUZIDO PELOS DIFERENTES TRATAMENTOS.....	44
4.5	ESTUDO DA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À INFLAMAÇÃO E À PERMEABILIDADE DA BARREIRA EPITELIAL (RT-qPCR).....	45
5	DISCUSSÃO	53
6	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXO	93

1 INTRODUÇÃO

A periodontite envolve processos inflamatórios multifatoriais que ocasionam destruição em tecidos de suporte dos dentes, causadas por bactérias presentes em biofilmes supra e subgingival (Papanou et al., 2018).

Patógenos como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a), *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* são espécies que desempenham um papel fundamental na composição do biofilme dental, levando ao aumento da proporção de organismos inflamofílicos e à expressão do potencial de virulência da microbiota disbiótica (Lamont; Hajishengallis, 2015).

A periodontite na sua antiga nomenclatura era classificada como crônica ou agressiva, com as suas subdivisões de localizada e generalizada (Armitage, 1999). A periodontite agressiva (PA) foi classificada devido às suas características de rápida destruição tecidual, localização das lesões, agregação familiar dos casos e quantidade de depósitos microbianos incompatíveis com a severidade da doença (Tonetti; Mombelli, 1999; Albandar, 2014; Fine et al., 2018). Porém sua terminologia mudou, de acordo com o Workshop para Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares de 2017 e a PA atualmente é denominada Periodontite grau C, estágio 3 ou 4, dependendo da severidade, padrão incisivo-molar (Caton et al., 2018).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, anteriormente classificado no gênero *Actinobacillus*, é o patógeno mais associado a PA (Nørskov-Lauritsen; Kilian, 2006). *A. actinomycetemcomitans* é um microrganismo Gram-negativo, capnofílico, sacarolítico, imóvel, anaeróbio facultativo e pode ser classificado em 6 sorotipos (a-f), sendo o sorotipo b o mais relacionado à doença, dentro do qual encontra-se o genótipo altamente leucotóxico - JP2 (Slots, 1982; Zambon et al., 1990; Asikainen et al., 1991; Olsen; Ambros, 1999; Kaplan et al., 2001; Teixeira et al., 2006; Haubek; Johansson, 2014). O clone JP2 é associado a descendentes hispânicos e africanos (Haubek, 2010; Shaddox et al., 2011). Estudos longitudinais mostraram que o clone JP2 é associado com o estabelecimento e progressão da perda óssea alveolar (Bueno et al., 1998; Haubek et al., 2008).

Um dos mais importantes fatores de virulência de *A. actinomycetemcomitans* é a sua capacidade de comprometer a resposta do hospedeiro através da produção de leucotoxina e de toxina distensora citoletal (CDT) (Herbert et al., 2016). A leucotoxina possui um elevado potencial inflamatório, pois consegue inativar neutrófilos, monócitos e células endoteliais humanas, e de alguns primatas não humanos, dificultando o seu uso em modelos experimentais animais (Dietmann et al., 2013; Fine et al., 2019). AaCDT inibe o ciclo celular e induz apoptose de células epiteliais, linfócitos T e dificulta a fagocitose por macrófagos (Mayer et al., 1999; Shenker et al., 2010; Ando-Suguimoto et al., 2020).

Interação microbiana

A cavidade oral humana abriga um ecossistema complexo que contém um conjunto diversificado de microrganismos com potenciais patogênicos diferentes. Um patógeno periodontal deve ser capaz de colonizar a região subgengival, destruindo tecidos de suporte do dente (Fives-Taylor et al., 1996; Rosen et al., 2003). A adesão da *A. actinomycetemcomitans* é associada à adesinas fimbriais e não fimbriais, que são capazes de interagir e aderir a receptores salivares na superfície dos dentes e proteínas da matriz extracelular, aderir a células epiteliais, e coagregar com outras bactérias, formando uma sinergia bacteriana no intuito de invadir as camadas de células epiteliais da bolsa periodontal e possivelmente penetrar no tecido conjuntivo (Fives-Taylor et al., 1996; Asakawa et al., 2003; Rosen et al., 2003). A formação dessa comunidade bacteriana e a capacidade de invasão desses periodontopatógenos são benéficas para o patógeno, pois mantém os produtos bacterianos como ácido lático produzido localmente e ao mesmo tempo, protege de fatores de defesa do hospedeiro e de agentes antimicrobianos externos (Sbordone; Bortolaia, 2003; Berezow; Darveau, 2011).

Para que haja colonização de *A. actinomycetemcomitans* nas superfícies periodontais, é necessária a colonização primária de bactérias consideradas comensais como *Streptococcus gordonii* (Nobbs et al., 2009). *A. actinomycetemcomitans* é anaeróbio facultativo, ou seja, pode proliferar tanto em ambientes com alto quanto com baixo oxigênio, o que tem consequências importantes para o seu metabolismo (Stacy et al., 2016). Essa comunicação

essencial entre espécies provoca uma sinergia polimicrobiana nos tecidos periodontais, aumentando o seu potencial patogênico (Hajishengallis; Lamont, 2012). Semelhante a outros estreptococos orais, *S. gordonii* consome rapidamente carboidratos e excreta dois produtos metabólicos primários, l-lactato e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que podem se acumular em altas concentrações nos biofilmes (Liu et al., 2011; Xiao et al., 2012). l-lactato é a fonte preferencial de carbono para *A. actinomycetemcomitans* (Brown; Whiteley, 2007). Em resposta ao H₂O₂ produzido por *S. gordonii*, um dos mecanismos de defesa de *A. actinomycetemcomitans* é a produção de uma enzima degradadora de biofilme Dispersina B (DspB), que lhe permite manter uma distância precisa de *S. gordonii*, para evitar o estresse oxidativo, mas manter o acesso ao l-lactato (Stacy et al., 2016).

Lipopolissacarídeo (LPS)

As bactérias Gram-negativas possuem na sua membrana externa o lipopolissacarídeo (LPS), importante ativador da resposta imunológica do hospedeiro induzindo a produção de moléculas biologicamente ativas, como as metaloproteinases da matriz (MMPs) e a prostaglandina E₂ (PGE₂) de monócitos ou macrófagos (Tuin et al., 2006). Além das alterações nas funções celulares, o LPS de *A. actinomycetemcomitans*, através do PGE₂, induz a liberação de citocinas, como IL-1, IL-6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) (Lindemann, 1988, 1989). Esse processo causa alterações fisiopatológicas durante a inflamação, resultando em dano tecidual (Stuehr; Griffith, 1992).

A. actinomycetemcomitans é classificado em seis sorótipos (a a f) correspondentes a cinco componentes estrutural e antigenicamente distintos do polissacarídeo O (O-PS) das suas respectivas moléculas lipopolissacarídicas (Kaplan et al., 2001). Geralmente os indivíduos são colonizados por diferentes sorótipos de Aa. No entanto, o sorótipo b foi mais frequentemente associado a periodontite padrão incisivo molar do que os demais. Os sorótipos b e c foram associados a periodontite enquanto o sorótipo a foi mais associado à saúde periodontal (Brigido et al., 2014). Além disso, a resposta aos diferentes sorótipos de Aa foi mostrado no estudo de Rebeis et al. (2019), onde foi visto que houve um aumento nos valores séricos de

Imunoglobulina G contra o sorotipo a e uma redução para os sorotipos b e c, em ambas as formas de periodontite agressiva em humanos.

Resposta do Hospedeiro

A resposta imune do hospedeiro exerce um papel importante no estabelecimento e progressão da doença periodontal (Diehl et al., 2003; Schenkein, 2007). Os leucócitos polimorfonucleares (PMNs) são células imunes inatas que podem desempenhar um papel defensivo e destrutivo na periodontite (Loss, 2006). Na infecção, são recrutados monócitos, neutrófilos e células dendríticas (DCs) que secretam uma gama de peptídeos antimicrobianos, como β -defensinas e catelicidinas, visando conter a invasão dos patógenos aos tecidos periodontais (Marshall, 2004), mas também metaloproteases e citocinas que podem levar a destruição tecidual (Birkedal-Hansen, 1993).

A. actinomycetemcomitans é capaz de atravessar o epitélio gengival para atingir sítios mais profundos, desencadeando uma resposta mais ampla do hospedeiro com o aumento de macrófagos e linfócitos no infiltrado inflamatório (Fives-Taylor et al., 1999). Com a presença de linfócitos foram detectados altos níveis de interferon- γ (IFN- γ) produzido pelas células Th1 em tecidos periodontais afetados, relacionados com a progressão da lesão (Garlet et al., 2003; Honda et al., 2006). *A. actinomycetemcomitans* ativa os receptores TLR2 e TLR4 das células dendríticas (Díaz-Zúñiga et al., 2015). TLR2 reconhece o polissacarídeo do LPS, enquanto TLR4 reconhece o lipídeo do LPS do periodontopatógeno (Raetz; Whitfield, 2002). A expressão de TLR2 e TLR4 é aumentada na periodontite, pois participa da progressão de eventos inflamatórios imunológicos que medeiam a reabsorção óssea alveolar e a destruição do tecido conjuntivo (Mori et al., 2003; Kajita et al., 2007; Kikkert et al., 2007).

Periodontia e doenças sistêmicas

Ao longo dos anos, a literatura evidenciou a correlação entre as doenças periodontais e o aparecimento e acentuação de doenças sistêmicas como as cardiovasculares (Tonetti; Van Dyke, 2013; Kholy et al., 2015), diabetes (Borgnakke

et al., 2013), obesidade (Keller et al., 2015), câncer colorretal (Koliarakis et al., 2019), síndrome metabólica (Kaye et al., 2016), doença respiratória (Scannapieco et al., 2003), doença renal crônica (Shultis et al., 2007) e artrite reumatóide (De Pablo et al., 2009). Há estudos que hipotetizam as ações direta e indireta de bactérias periodontais causando distúrbios sistêmicos no hospedeiro (Li et al., 2020).

A primeira hipótese refere-se a sua ação direta, ou seja, a colonização de sítios distantes promovida pela bacteremia, quando as bactérias entram na corrente sanguínea pelo epitélio periodontal ulcerado (Takeuchi et al., 2011; Tomas, 2012; Reyes et al., 2013), ou de procedimentos mecânicos como uso do fio dental e escovação (Lafaurie et al., 2007; Castillo et al., 2011). Ao conseguir invadir barreiras biológicas, as bactérias, induzem uma cascata de mediadores pró-inflamatórios que entram na circulação sanguínea e induzem uma resposta inflamatória em outros órgãos. Além disso, as bactérias possuem condição de se espalhar para locais diversos através de células imunes (Tonetti, 2009; Genco; Van Dyke, 2010; Hajishengallis, 2015).

O LPS pode induzir uma série de alterações no hospedeiro que podem resultar em dano. Estudos tem demonstrado a associação entre a periodontite e doenças cardiovasculares. As células espumosas participam da formação das placas de ateroma, e infecções crônicas podem contribuir com este processo. As propriedades aterogênicas do LPS derivado de *A. actinomycetemcomitans* e os seus efeitos em células semelhantes a macrófagos, nomeadamente, células RAW 264,7, foram examinadas em vários estudos (Pussinen et al., 2004; Lakio et al., 2006). Macrófagos podem se tornar células espumosas por ação de LDL (lipoproteínas de baixa densidade). No entanto, um estudo in vitro usando monócitos murinos RAW264.7 mostrou que o LPS de *Aa* foi capaz de aumentar a formação de células espumosas induzidas por LDL, estimulou a expressão do receptor para LDL nestas células e a internalização do LDL, sugerindo uma participação do patógeno na relação entre doenças cardiovasculares e periodontite (Morishita et al., 2013).

O sorotipo b é capaz de induzir maior resposta de citocinas pró-inflamatórias em células dendríticas do que os demais sorotipos. Além disso, o sorotipo a tem a capacidade de modular a resposta induzida pelo sorotipo b em ensaio de co-infecção de células dendríticas (Rojas et al., 2018).

Periodontite foi associada a outras doenças como doença de Alzheimer, mas os mecanismos envolvidos ainda são pouco compreendidos. Estudos demonstraram associação entre a colonização por *P. gingivalis* e a doença (Liccardo et al., 2020). No entanto, existem evidências de que *A.actinomycetemcomitans* poderia também ser ligado ao processo. Estudo in vitro demonstrou que o LPS purificado do sorotipo b induz um maior nível de citocinas inflamatórias em culturas primárias de microglia ou células do hipocampo do que os demais, enquanto o LPS do sorotipo a aumenta a expressão de citocinas modulatórias IL-4 e IL-10. As células do hipocampo tratadas com o LPS do sorotipo b exibiram também alterações morfológicas e níveis elevados de peptídeo secretado Beta amilóide (Díaz-Zúñiga et al., 2019).

Microbiota intestinal

Bactérias orais podem levar a alterações sistêmicas por induzir uma disbiose na microbiota intestinal, rompendo a integridade da barreira intestinal, como demonstrado em modelos animais (Hasturk et al., 2007; Hajishengallis et al., 2011). Como por exemplo, estudos em modelo murino demonstraram que a administração oral de altas doses do patógeno periodontal *P. gingivalis* induz aumento da inflamação sistêmica, endotoxemia, níveis séricos elevados de glicose, resistência à insulina e diminuição na função da barreira intestinal. Também ocorreram alterações na composição da microbiota intestinal, com aumento da abundância de *Bacteroidetes* (principalmente a ordem Bacteroidales), diminuição da abundância de *Firmicutes* e aumento da abundância de *Prevotella*. Apesar dos baixos níveis de *P. gingivalis*, foi sugerido que o patógeno induziu alteração da microbiota intestinal resultando em alteração da permeabilidade da barreira intestinal (Hasturk et al., 2007; Hajishengallis et al., 2011; Arimatsu et al., 2014; Nakajima et al., 2015a). É importante ressaltar que as mudanças na microbiota intestinal precederam as alterações inflamatórias sistêmicas (Nakajima et al., 2015a,b). Dados mais recentes revelaram disbiose dos microbiomas orais e intestinais em pacientes com periodontite crônica (Lourenço et al., 2018; Kawamoto et al., 2021) e padrão molar /incisivo (Amado et al., 2020).

Neste estudo, os dados de microbioma oral revelaram a abundância de *A. actinomycetemcomitans*, particularmente nos sítios periodontais afetados, além de outros grupos microbianos como bactérias redutoras de sulfato, enquanto o microbioma fecal destes pacientes diferia na abundância de bactérias redutoras de sulfato.

A disbiose intestinal também foi associada a vários distúrbios metabólicos, como a diabetes (Tamboli et al., 2004), obesidade e inflamação (Arora, Backhed, 2016). Por outro lado, a microbiota intestinal é afetada positivamente pelo exercício (Pasini et al., 2019).

A microbiota intestinal contribui para várias funções fisiológicas essenciais como metabolismo energético, sinalização metabólica, formação do sistema imune e regulação da integridade da barreira do intestino (Brunkwall, Orho-Melander, 2017). As proteínas *tight junctions* (TJ), como claudinas e ocludinas (Anderson, 2001), mantém a integridade desta barreira, regulando a passagem de água, íons, solutos e outras moléculas pequenas (Tsukita et al., 2001). A integridade do epitélio oral também é mantida pelas proteínas “tight junction” como claudina e ocludina e a proteína citoplasmática ZO-1 (Shen, 2012) e junção aderente (zônula aderente) que são complexos que interagem como andaimes intracelulares e moléculas de sinalização (Miyaguchi, 2000; Meng; Takeichi, 2009; Kowalczyk; Nanes, 2012; Shen et al., 2017).

A disbiose intestinal resulta em invasão bacteriana na parede do epitélio do intestino. Alterações da microbiota do intestino foram associadas à alteração da permeabilidade intestinal, resultado de mudanças no perfil transcricional das proteínas *tight junction* (Martínez-Oca et al., 2020). No entanto, um intestino com permeabilidade aumentada devido à abertura das *tight junctions* pode não ser suficiente para induzir a inflamação da mucosa, mas pode induzir uma resposta imune adaptativa devido ao aumento do desafio ao sistema imunológico (Ahmad et al., 2017). Os efeitos de *Aa* sobre a barreira intestinal ainda são pouco conhecidos. Komazaki e colaboradores (2017) mostraram que a administração oral de *Aa* em camundongos foi capaz de induzir doença hepática gordurosa não alcoólica, alterando a microbiota intestinal, e influenciando também a resistência à insulina desses animais. Por seu repertório de virulência, seria possível que *Aa* pudesse

alterar o microbioma intestinal, mas também induzir diretamente dano a barreira intestinal. AaCDT induz mudanças na morfologia da barreira epitelial oral, levando à distensão celular e ao espaçamento intersticial entre essas células, rompendo a integridade dessa barreira mantida por proteínas transmembranas, citosólicas e citoesqueléticas (DiRienzo, 2014a).

Periodontite experimental

Para aprofundar a compreensão da complexa etiologia da doença periodontal, são utilizados estudos induzindo a periodontite experimental, através de patógenos isolados da cavidade oral do homem, em animais (Graves, 2008). Além de vincular a periodontite induzida por microrganismos orais a condições sistêmicas (Lally et al., 1994), modelos animais têm sido utilizados na literatura como uma alternativa para compreender a patogênese da doença periodontal, pois conseguem avaliar de forma longitudinal a doença em nível celular e molecular (Graves, 2008).

Uma forma de introduzir cepas de bactérias humanas em modelos de roedores é através de gavagem oral, com impacto no periodonto e gerando uma resposta sistêmica (Chang et al., 1988; Klausen, 1991). Garlet e colaboradores (2005) conseguiram induzir perda óssea em camundongos C57BL/6 administrando Aa por gavagem oral. A gavagem com Aa resulta na formação de infiltrados inflamatórios na bolsa periodontal e na área do tecido conjuntivo gengival, consistindo em linfócitos T e B e CD14 + monócitos / macrófagos (Teng et al., 1999; Teng et al., 2000). Uma alternativa amplamente usada é a injeção localizada de bactérias ou do seu LPS nos tecidos do palato gengival, e esta metodologia permite analisar a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e fatores pró-reabsorção óssea (Rogers et al., 2007; Sartori; Kirkwood, 2009; Lin et al., 2011; de Molon et al., 2014). Esse método também promove inflamação periodontal significativa, migração apical do epitélio juncional, diferenciação e ativação dos osteoclastos e perda óssea alveolar (Rogers et al., 2007; Sartori; Kirkwood, 2009; Lin et al., 2011; de Molon et al., 2014).

Após a indução, as amostras de mandíbula com perda óssea podem ser avaliadas, através do uso da tomografia micro-computadorizada, onde já foi observado que ao utilizar esse método, houve aumento da precisão e a reprodutibilidade da interpretação da perda óssea no modelo experimental murino da doença periodontal (Wilensky et al., 2005).

Portanto, o objetivo deste estudo é induzir uma periodontite experimental em camundongos visando compreender a patogênese periodontal, analisando o papel da resposta do hospedeiro e virulência dos organismos periodontais induzidas por *S. gordonii* e *A. actinomycetemcomitans* e seus efeitos sobre a barreira intestinal e inflamação sistêmica.

2 PROPOSIÇÃO

O presente estudo buscou avaliar o efeito da administração oral de um consórcio microbiano formado por *A. actinomycetemcomitans* e *S. gordonii* na indução de periodontite experimental e na disbiose e permeabilidade intestinal.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O efeito da administração oral do consórcio microbiano formado por *A. actinomycetemcomitans* e *S. gordonii* foi determinado em modelo experimental in vivo de periodontite, avaliando-se:

- colonização oral e intestinal pelo patógeno *A. actinomycetemcomitans*;
- a perda óssea alveolar, determinada por microCT;
- a disbiose intestinal pela avaliação da proporção Firmicutes/Bacteroidetes;
- a expressão de genes associados à inflamação e a permeabilidade do epitélio no intestino por RT-qPCR;
- níveis séricos de LPS.
- modelo murino experimental de infecção com *A. actinomycetemcomitans*

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi realizado após apreciação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (Anexo A) foi realizado à luz dos princípios éticos em experimentação animal elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2 ANIMAIS E CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO

Foram utilizados camundongos da linhagem C57/BL6 SPF (Specific Pathogen Free), com 6-8 semanas de idade, procedentes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos no biotério de criação de camundongos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, em gaiolas com filtros microisoladores, acondicionados em estantes com ventilação, criados em condições livres de patógenos.

O cálculo amostral foi realizado para verificar diferenças significativas em relação ao desfecho de perda óssea alveolar, com alfa de 5%, poder de 80% e considerando uma perda de 10% dos animais durante o experimento, baseado em resultados previamente publicados por Garlet et al. (2006). Foram necessários 12 animais experimentais que foram divididos aleatoriamente em 4 grupos. Os animais foram acompanhados observando-se o peso, perda de mobilidade, condições da pelagem e presença de lesões cutâneas.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais (n=48) foram alocados aleatoriamente em 4 grupos, sendo 12 animais por grupo.

Os grupos serão divididos conforme a seguir:

Grupo 1= Controle negativo (SHAM)

Grupo 2= *A. actinomycetemcomitans*

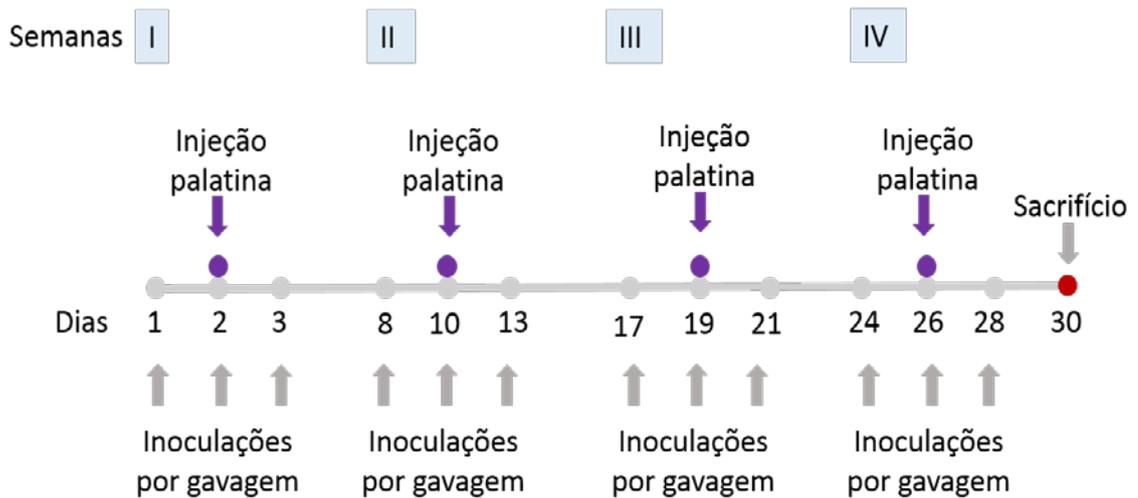
Grupo 3= *S. gordonii*

Grupo 4= *A. actinomycetemcomitans* + *S. gordonii*

Os animais do grupo controle negativo (*SHAM*), bem como os animais infectados com os diferentes microrganismos, receberam o mesmo tratamento e o veículo usado para infecção bacteriana, nos mesmos períodos e foram mantidos nas mesmas condições, porém em gaiolas separadas para evitar contaminação. Os protocolos utilizados para as infecções foram adaptados de Repeke et al., 2010 e de Monasterio et al., 2019. Para otimizar a infecção e a perda periodontal, além da inoculação oral dos organismos com auxílio de agulha de gavagem (Repeke et al., 2010), o patógeno *A. actinomycetemcomitans* foi também inoculado por injeção no palato do lado esquerdo nos grupos 2 e 4. Para determinar o efeito desta inoculação no tecido conjuntivo sobre a inoculação na cavidade oral, a perda óssea alveolar da maxila esquerda foi comparada a observada na maxila direita. Os animais do grupo SHAM (1), e do grupo 3 também receberam injeção na região do palato do lado esquerdo com o veículo PBS.

O delineamento experimental está representado na figura 3.1.

Figura 3.1 - Delineamento do ensaio de periodontite experimental. 3 vezes por semana, durante 4 semanas os animais foram inoculados por via oral com 1×10^8 UFC/mL de *A. actinomycetemcomitans* e/ou *S. gordonii* ressuspenso em gel de carboximetilcelulose em PBS. Os grupos inoculados com *A. actinomycetemcomitans* também receberam injeção de 1×10^7 UFC/mL de *A. actinomycetemcomitans* suspenso em PBS no palato esquerdo. Dia 30: após jejum de 5h, os animais foram sacrificados



Fonte: A autora.

3.4 CEPAS UTILIZADAS

Foram empregados três grupos experimentais: o primeiro grupo foi infectado por *A. actinomycetemcomitans* JP2. O segundo por *S. gordonii* DL1. O terceiro foi formado por consórcio com *A. actinomycetemcomitans* JP2 e *S. gordonii* DL1. As amostras foram obtidas de um estoque do laboratório de Microbiologia Oral, mantidas em glicerol 20%, em freezer a -80°C (Revco Scientific, Waltham, MA, EUA). As amostras de *A. actinomycetemcomitans* foram cultivadas em placas de ágar ou caldo triptone soja acrescido de 0,5% de extrato de levedura, a 37°C , em condições de microaerofilia. Já *S. gordonii* foi cultivado a 37°C em THB contendo 5% de extrato de levedura.

3.5 INOCULAÇÕES DE MICRORGANISMOS

A cepa *A. actinomycetemcomitans* JP2 foi cultivada em microaerofilia a 37°C, em 5-10% de CO₂ em caldo de triptone soja (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) suplementada com 0,5% extrato de levedura (Difco Laboratories). Para realizar os ensaios, meio líquido foi usado para cultivar bactérias até a fase mid-log de crescimento. Para o *A. actinomycetemcomitans*, a suspensão foi ajustada para uma absorvância de ~ 0,3 a densidade óptica de 490nm (DO490nm) que correspondente a 1×10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) / ml (Genesys 10S VIS). Em seguida, a cultura foi centrifugada (355 xG por 5 min) e o sedimento celular foi suspenso em solução salina tamponada com fosfato (1x PBS) para obter uma absorvância de 1,02 (DO 590nm), correspondendo a 1×10^9 UFC/ mL. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e as células precipitadas foram ressuspensas em 500 µL de leite desnatado Molico a 10% acrescido de 5% de L-glutamato de sódio monohidratado (Sigma-Aldrich), e 5% de solução de dithiothreitol (Sigma- Aldrich), a suspensões foram transferidas para criotubos (100 µL por amostra) e, imediatamente, foram congelados a -80 °C. As amostras foram então liofilizadas em Freezone Triad Freezer Dryers (Labconco, Flawil, Suíça) em -40oC, sob vácuo. O material liofilizado foi armazenado em freezer -80oC.

Três vezes por semana, os animais dos grupos 2 e 4 foram inoculados via oral com auxílio de agulha de gavagem com 1×10^9 UFC *A. actinomycetemcomitans* em 100µL de PBS acrescido de 2,0% de carboximetilcelulose (Repeke et al., 2010). Além disso, semanalmente, receberam uma injeção palatina de 1×10^7 UFC de *A. actinomycetemcomitans* em 10µL de 1x PBS por meio de uma seringa de calibre 26G na gengiva interproximal entre o primeiro, o segundo e o terceiro molares do lado esquerdo (Monasterio et al., 2019).

S. gordonii foi cultivado em placas de BHI em condições anaeróbicas e foi cultivado em caldo BHI durante um período de 16hs até a fase mid-log e em seguida, a cultura foi centrifugada (355 xg, 5 min) e o sedimento celular foi suspenso em 1x PBS para obter uma absorvância de 1,02 a uma DO, correspondendo a 1×10^{12} UFC/mL. Após isso, o sobrenadante foi descartado e as células precipitadas foram ressuspensas em 500 µL de leite desnatado Molico a 10% acrescido de 5% de L-glutamato de sódio monohidratado (Sigma-Aldrich), e 5% de solução de dithiothreitol (Sigma- Aldrich), a suspensões foram transferidas para criotubos (100

μL por amostra) e, imediatamente, foram congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. As amostras foram então liofilizadas em Freezone Triad Freezer Dryers (Labconco, Flawil, Suíça) em -40°C , sob vácuo. O material liofilizado foi armazenado em freezer -80°C .

Três vezes por semana, os animais dos grupos 3 e 4 foram inoculados via oral com auxílio de agulha de gavagem com 1×10^8 UFC *S. gordonii* em $100\mu\text{L}$ de 1x PBS acrescido de 2% de carboximetilcelulose. O grupo 3 recebeu injeção palatina com PBS e o grupo 4 recebeu injeção no palato do lado esquerdo com o veículo do *A. actinomycetemcomitans* inoculado.

Animais controles SHAM foram inoculados apenas com veículo (carboximetilcelulose 2% em 1xPBS).

3.6 EUTANÁSIA E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Os animais foram anestesiados com uma associação de ketamina (Dopalen 10%, Laboratório Vetbrands, Rio de Janeiro, Brasil) e xilazina (Ansedan 2%, Laboratório Vertbrands, Rio de Janeiro, Brasil), diluída em solução salina fosfatada PBS (8g NaCl, 1g KCl, 3,5g Na₂HPO₄ e 1g KH₂PO₄) estéril, em proporções de 5,4% de ketamina, 8,6% de xilazina e 86% PBS estéril, administrada via intraperitoneal (300µl por animal). Uma amostra de sangue foi obtida por punção cardíaca após anestesia a fim de minimizar a contaminação, e os camundongos foram eutanasiados por exsanguinação. Após a remoção do tecido gengival, as hemimaxilas direita e esquerda foram transferidas para tubos contendo solução de formaldeído a 4% e assim mantidas por 24 horas em temperatura ambiente, seguindo-se transferência para solução salina fosfatada 1x PBS (8g NaCl; 1g KCl; 3,5g Na₂HPO₄; 1g KH₂PO₄) e armazenamento a 4°C até a análise por microtomografia computadorizada. Uma porção do intestino foi coletada e transferida para solução de RNA^{later}™ Stabilization Solution (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituânia) para análise da expressão gênica e armazenada a -80°C. Foram coletados biofilme oral com auxílio de 6 microbrushs estéreis passados 10 vezes na cavidade oral de cada animal e o conteúdo intestinal, ambos foram armazenados em tampão estéril Tris-EDTA, pH 7,4, para determinação das alterações na microbiota.

3.7 NÍVEIS DE LPS EM SORO

Os níveis de lipopolissacaríde foram medidos usando o Kit de Quantificação de Endotoxina Cromogênica Pierce LAL número 88282 - Thermo Scientific™, Rockford, Illinois, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram diluídas para 1:50 e aquecidas por 15 min a 70 ° C. O controle interno do cálculo da recuperação foi incluído na avaliação. Foram utilizadas soluções (0,1 a 1 unidades de endotoxina (UE) / mL) do Padrão de Endotoxina LPS (*E. coli* 011: B4)

para determinar a concentração de endotoxina de cada amostra desconhecida e absorvância a 405 nm no espectrofotômetro de microplacas Epoch™ 2 (BioTeck, Winooski, VT, EUA).

3.8 ESTUDO DA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À INFLAMAÇÃO E À PERMEABILIDADE DA BARREIRA EPITELIAL (RT-QPCR)

As amostras de jejuno foram submetidas à extração de RNA utilizando Trizol LS Reagente (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), conforme instruções do fabricante com auxílio do Mini-BeadBeater (BioSpec 3110BX Mini-BeadBeater-1 High Energy CellDisrupter) por 20 segundos, duas vezes. Foram utilizados 1mL de Trizol por fragmento de tecido intestinal. Após a incubação por 30 minutos, foram adicionados 100µl de clorofórmio (LabSynth, São Paulo, São Paulo, Brasil), seguindo-se incubação por 15 minutos em temperatura ambiente e centrifugação (12.000 xg/ 15 minutos/ 4°C). O RNA na fase aquosa foi precipitado com isopropanol (LabSynth, São Paulo, São Paulo, Brasil) e os sais removidos com lavagem por duas vezes com etanol (75%) (LabSynth, São Paulo, São Paulo, Brasil). Após a secagem em temperatura ambiente, o RNA resultante foi ressuscitado em água livre de RNase (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA/EUA), e tratado com desoxirribonuclease (Ambion™ DNase I, RNase-free, Life Technologies, Carlsbad, CA/EUA) por 15 minutos a 25°C. A enzima foi inativada pelo calor (65°C por 10 minutos) e o RNA foi quantificado por mensuração em espectrofotômetro 260 e 280nm (Nanodrop Technologies ND-1000-DE/ EUA) e então utilizado para a síntese de cDNA. A síntese da fita de cDNA foi realizada com o uso do kit SuperScript™ Vilo™ Synthesis Kit para RT-PCR (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), conforme as instruções do fabricante. Foram adicionados 4µl de 5X VILOTM Reaction Mix, 2µl de 10X SuperScript™ Enzyme Mix, e RNA a uma concentração determinada de cada amostra e adicionado água para obter um volume total de 20µl da reação.

Após o ciclo inicial de 10 minutos a 25°C, a reação foi realizada por 1 hora a 42°C e então o material será submetido a 85°C por 5 minutos. O cDNA foi estocado a -20°C até o momento do uso. O PCR quantitativo foi realizado em um termociclador StepOne Plus System (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) para análise da expressão gênica. Foram utilizados oligonucleotídeos e sondas comerciais Taqman (Applied Biosystem, Foster City, Califórnia, EUA) para camundongos para os genes no tecido gengival e intestino: *il-1 β* e *il-10* (Tabela 3.1). Cada reação foi realizada utilizando 0,5 μ l 20x TaqMan™ Gene Expression Assay (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituânia), 5 μ l 2x PCR Master Mix 2x (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituânia), 4 μ l de cDNA (100ng), 3,5 μ l água RNase free (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA/EUA) para um volume final de 10 μ l. O ciclo foi 50 ° C / 2 min., 95 ° C / 10 min., seguido de 40 ciclos a 95 ° C / 15 s., 60 ° C / 1min, em um termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Nestes ensaios a quantificação relativa da expressão dos genes alvo foi realizada pelo método do $\Delta\Delta$ CT, utilizando os genes *β -actina* e *gapdh* como controles endógenos (PFAFFL, 2001).

Tabela 3.1 - Referência das sequências de Sondas/primers Taqman utilizadas para cada gene alvo cuja expressão foi avaliada por RT-qPCR

Gene	Referência da sequência
<i>il-1β</i>	Mm00434228_m1
<i>il-10</i>	Mm01288386_m1
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1
<i>β-actin</i>	Mm00607939_s1

Fonte: A autora.

Para avaliação da expressão de genes relacionados à permeabilidade da barreira epitelial oral e do intestino foi determinada a expressão dos genes *claudina 1*, *occludina* e *zonulina* (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-qPCR

Gene	Sequência	
<i>cldn1</i>	5'-AAGTGCTTGGAAGACGATGA3'	5'-AAGTGCTTGGAAGACGATGA-3' (Wang, 2010)
<i>Ocln</i>	5'-CCAATGTGCAGGAGTGGG-3'	5'-CGCTGCTGTAACGAGGCT-3' (Wang, 2010)
<i>Zo-1</i>	5' AGGACACCAAAGCATGTGAG 3'	5' GGCATTCCTGCTGGTTACA 3' (Castoldi, 2017)

Fonte: A autora.

3.9 ANÁLISE EM PCR EM TEMPO REAL DOS NÍVEIS DE *A. Actinomycetemcomitans* EM AMOSTRAS DE CONTEÚDO INTESTINAL E BIOFILME ORAL

A extração do DNA das amostras de biofilme oral e conteúdo intestinal foi realizada com a utilização do kit Meta-G-Nome™ DNA Isolation - MGN0910 (Epicentre, EUA). Após a extração, a quantidade e qualidade do DNA foram estimadas por espectrometria (Nanodrop ND1000 - Thermo Fisher Scientific Inc.).

Para detecção de níveis de *A. actinomycetemcomitans* foi realizado PCR em tempo real, usando os oligonucleotídeos para o gene rRNA 16S específico para estes microrganismos, como realizado em outros estudos neste laboratório (Teixeira et al., 2009). A análise quantitativa foi realizada comparando-se os resultados obtidos com as amostras aos dados obtidos com curva padrão a partir do DNA molde contendo 10 a 10⁸ cópias de 16S rRNA *A. actinomycetemcomitans* em plasmídeo recombinante [pPCR 2.1 TOPO TA® vector, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA, com o inserto de 1.500pb do gene *16SrRNA* de *A. actinomycetemcomitans*.

Para a reação de PCR, foram utilizados 5µL de SYBR Green, 1,0 µL DNA molde, 0,25µL de cada oligonucleotídeo de solução estoque de 25 pmol/µL (5'-ATTGGGGTTTAGCCCTGGT-3' e 5'-GGCACAAACCCATCTCTGA-3' (Rudney et al., 2003) e 3,5µL de água ultrapura para um volume final de 10 µL. Foram realizados 40 ciclos de 95°C/15seg, 65°C/1min, 81°C/10seg seguidos de duas etapas a 95°C/15seg e 65°C/1min e uma etapa final a 0.5–95°C/15seg. O número de células de *A. actinomycetemcomitans* foi calculado assumindo-se 6 cópias do gene 16S rRNA/cromossomo (<https://rrndb.umms.med.umich.edu/genomes>).

3.10 ANÁLISE EM PCR EM TEMPO REAL DA PROPORÇÃO FIRMICUTES/BACTEROIDETES DO BIOFILME

A extração do DNA do conteúdo intestinal foi realizada usando o kit de isolamento de DNA Meta-G-Nome™ MGN0910 (Epicentro, EUA). Após a extração, a quantidade e a qualidade do DNA foram estimadas por espectrometria (Nanodrop ND1000 - Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituânia). Os níveis de bactérias foram determinados por PCR em tempo real, usando pares de iniciadores específicos para Firmicutes e Bacteroidetes (Tabela 3.3). A reação foi composta por 1µl da amostra de DNA (contendo 10ng / mL de DNA), 5µl de PCR em tempo real SYBR Green® Master Mix (Invitrogen Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 0,25µl de cada oligonucleotídeo (concentração final 25pMol) e 4µl de água livre de RNase para um volume final de 10 µl. A reação foi ajustada para 50 ° C / 2 min., 95 ° C / 10 min., seguido de 40 ciclos a 95 ° C / 15 s., 60 ° C / 1min, em um termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Tabela 3.3 - Sequência dos iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR da Proporção firmicutes/Bacteroidetes

<i>Firmicutes</i>	F-GAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA R- AGCTGACGACAACCATGCAC	Guo et al. 2008
<i>Bacteroidetes</i>	F- GARCATGTGGTTTAATTCGATGAT R- AGCTGACGACAACCATGCAG	Guo et al. 2008

Fonte: A autora.

3.11 MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA (MicroCT)

A perda óssea alveolar foi determinada usando um microtomógrafo (SkyScan 1176 versão 1.1, Bruker Biospin, Kontich, Bélgica) a 45kV de voltagem, 550uA de corrente, 8,71µm tamanho do pixel, filtro de alumínio 0,2mm no departamento de Radiologia da UNICAMP. Após escaneamento das hemimaxilas esquerda dos animais, as imagens foram analisadas calculando-se o volume ósseo, porcentagem de volume ósseo e porcentagem total de porosidade do volume ósseo (CT Analyzer software Version 1.15.4.0, SkyScan, Bruker Biospin, Kontich, Bélgica) da região interproximal entre o primeiro e o segundo molar do lado esquerdo (área de 60 x 30 pixels selecionada em 15 cortes coronais a partir da JEC do segundo molar).

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram testados em relação à normalidade com teste estatístico Kolmogorov-Sminorv com correlação de Lilliefors e a homogeneidade de variâncias foi avaliada pelo teste F. Foi utilizado o teste ANOVA um fator, teste de Comparação Múltipla de Tukey para análises estatísticas de dados normais. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$. A análise foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prisma® Versão 6.0 (Software GraphPad, La Jolla, EUA).

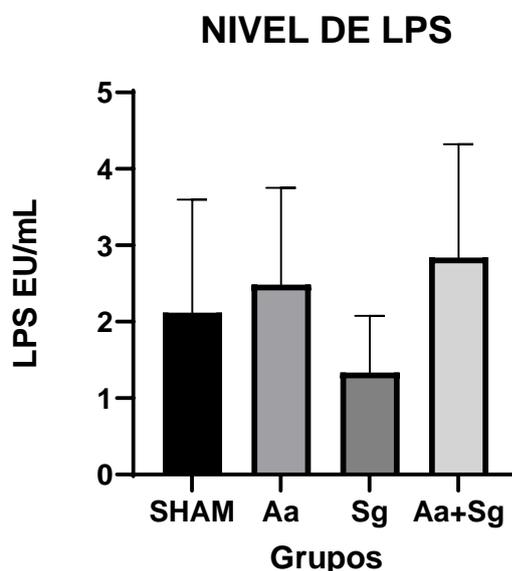
4 RESULTADOS

4.1 NÍVEIS DE LPS NO SORO

Para determinar se a infecção experimental resultou em maiores níveis de LPS na corrente circulatória, o que poderia indicar alterações na permeabilidade do intestino, foram analisados os níveis séricos de LPS ao final do período experimental.

Apesar dos valores médios de unidades de endotoxina (EU) serem maiores nos grupos infectados por *A. actinomycetemcomitans* (Aa+Sg e Aa), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos níveis séricos de LPS entre os grupos (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Níveis de LPS em Unidades de Endotoxina (EU) por ml de soro, (determinado pelo ensaio de Limulus) de camundongos C57BL/6 após o período experimental de 30 dias dos seguintes grupos: SHAM (controle negativo não infectado), Aa (com administração de *A. actinomycetemcomitans* via oral e por injeções palatinas), Sg (com administração de *S. gordonii* via oral) e Aa + Sg (com administração de *S. gordonii* via oral e administração de *A. actinomycetemcomitans* via oral e por injeções palatinas). ANOVA com pós teste de Tukey $p > 0,05\%$



Fonte: O autor.

4.3 ANÁLISE EM PCR EM TEMPO REAL DOS NÍVEIS DE *A. ATINOMYCETEMCOMITANS* EM AMOSTRAS DE CONTEÚDO INTESTINAL E BIOFILME ORAL

Os níveis de *A. actinomycetemcomitans* em amostras de biofilme oral e conteúdo intestinal foram determinados pela amplificação de 16SrRNA usando iniciadores específicos para a espécie e determinado o número de cópias do gene

16SrRNA. Como controle da reação e objetivando determinar a proporção do patógeno, foi realizada também a qPCR utilizando primers universais para Bacteria.

O patógeno não foi detectado em nenhuma amostra testada, indicando que a inoculação oral do consórcio microbiano não induziu a colonização persistente de *A. actinomycetemcomitans* do biofilme oral e no conteúdo intestinal.

Os dados de média e desvio padrão de número de cópias de 16SrRNA presentes em 1 µl de DNA obtido do biofilme oral de cada um dos grupos experimentais estão apresentados na tabela 5.1. Estes dados indicam a qualidade da reação de PCR.

Tabela 5.1 - Níveis de bactérias totais no biofilme (média e desvio padrão) de camundongos C57BL/6 após o período experimental de 30 dias dos seguintes grupos: SHAM (controle negativo não infectado), Aa (com administração de *A. actinomycetemcomitans* via oral e por injeções palatinas), Sg (com administração de *S. gordonii* via oral) e Aa + Sg (com administração de *S. gordonii* via oral e administração de *A. actinomycetemcomitans* via oral e por injeções palatinas)

Grupo	Número de cópias 16SrRNA Bacteria no biofilme oral
	Média ± dp
<i>SHAM (Controle negativo)</i>	$5 \times 10^6 \pm 5 \times 10^6$
<i>Aa</i>	$5 \times 10^6 \pm 5 \times 10^6$
<i>Sg</i>	$5 \times 10^5 \pm 5 \times 10^6$
<i>Aa+Sg</i>	$5 \times 10^6 \pm 5 \times 10^6$

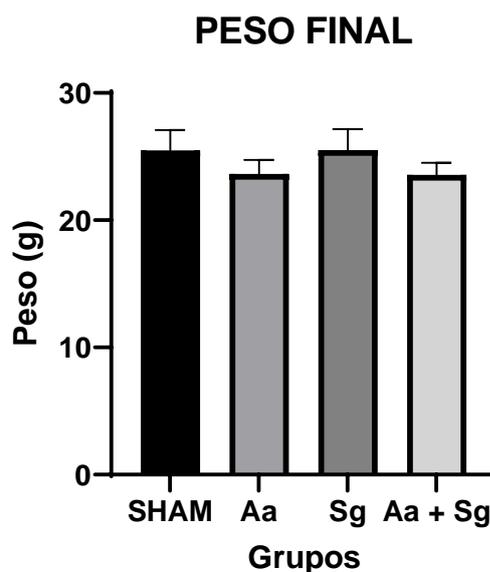
Fonte: A autora.

4.4 EFEITOS COLATERAIS E GANHO DE PESO INDUZIDO PELOS DIFERENTES TRATAMENTOS

Durante o período experimental, não houve nenhuma intercorrência. Os animais, de todos os grupos experimentais, foram monitorados e não tiveram alterações cutâneas, na pelagem, comportamentais ou locomotoras, bem como quaisquer características que indicassem comprometimento visível.

Para monitoramento no ganho de peso, os animais foram pesados no início e no final do experimento. Apesar do ganho de peso durante o período experimental ter sido menor nos animais infectados com *A.actinomyetemcomitans*, não foi detectada diferença estatística no ganho de peso entre os grupos, como apresentado na figura 4.2.

Figura 4.2 - Ganho de peso (em gramas) de camundongos C57BL/6 após o período experimental de 30 dias dos seguintes grupos: SHAM (controle negativo não infectado), Aa (com administração de *A. actinomyetemcomitans* via oral e por injeções palatinas), Sg (com administração de *S. gordonii* via oral) e Aa + Sg (com administração de *S. gordonii* via oral e administração de *A. actinomyetemcomitans* via oral e por injeções palatinas)

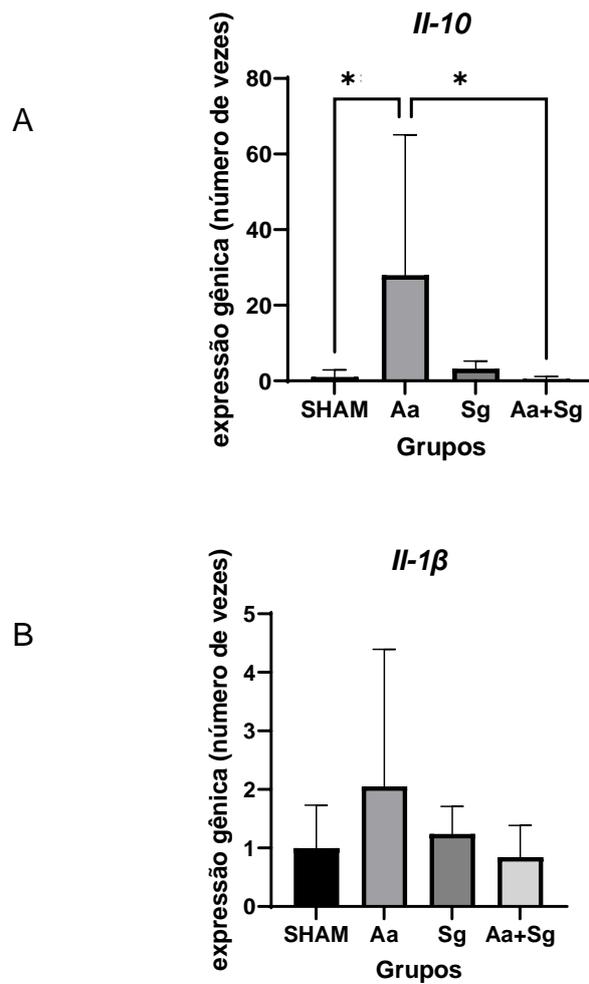


Fonte: A autora.

4.5 ESTUDO DA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À INFLAMAÇÃO E À PERMEABILIDADE DA BARREIRA EPITELIAL (RT-qPCR)

A análise da expressão gênica dos genes que codificam as citocinas IL-1 β e IL-10 revelou que a administração de *A. actinomycetemcomitans* foi capaz de induzir a expressão do gene *Il-10* ao final do período experimental, mas não do consórcio microbiano, existindo diferença estatística entre os outros grupos (Figura 4.3A). Apesar da administração do *A. actinomycetemcomitans* ter indicado maior expressão de *Il-1 β* no intestino, esta diferença não foi significativa (ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, $p > 0.05$) (Figura 4.3B). Os resultados da expressão relativa (após normalização com o controle endógeno *Gapdh*) de cada gene alvo estão apresentados em número de vezes (fold changes) em relação ao controle negativo (SHAM).

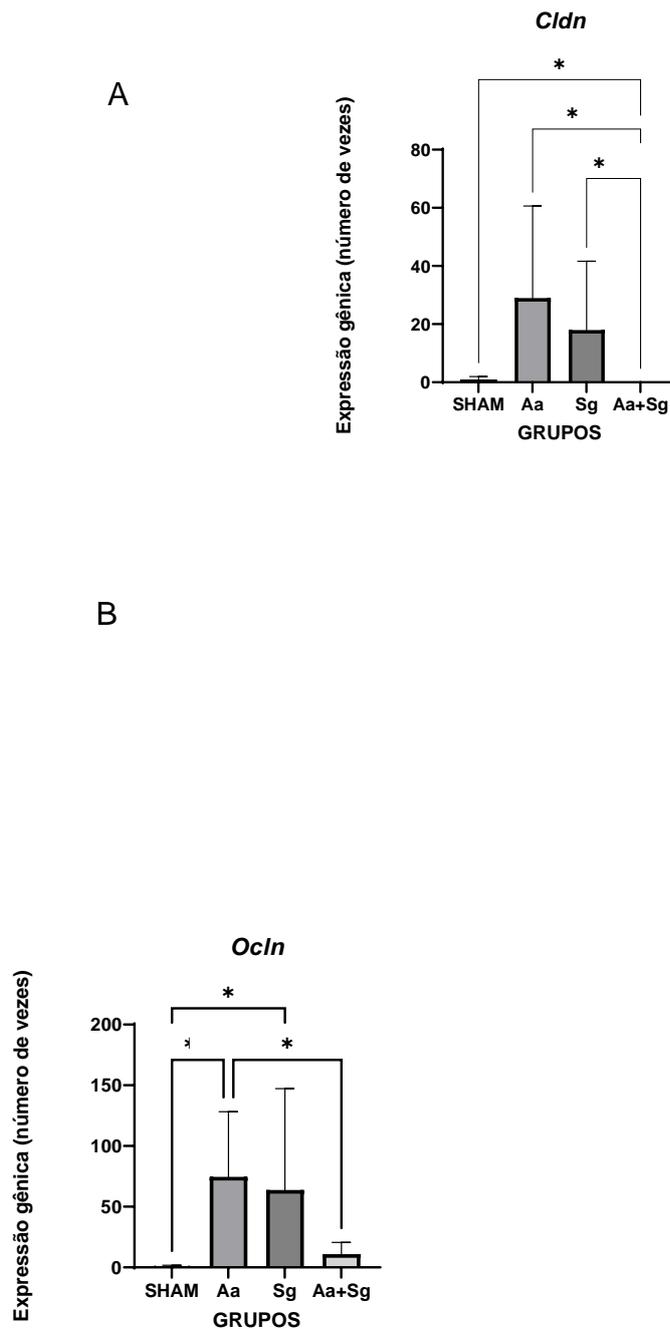
Figura 4.3 – Expressão genica relativa de *Il-10* (A) e *Il-1 β* (B), expressa em número de vezes em relação ao controle negativo (SHAM), determinada por RT-qPCR em intestino de camundongos C57BL/6 após o período experimental de 30 dias dos seguintes grupos: SHAM (controle negativo não infectado), Aa (com administração de *A. atinomycescomitans* via oral e por injeções palatinas), Sg (com administração de *S. gordonii* via oral) e Aa + Sg (com administração de *S. gordonii* via oral e administração de *A. atinomycescomitans* via oral e por injeções palatinas). ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, *** p <0,05%



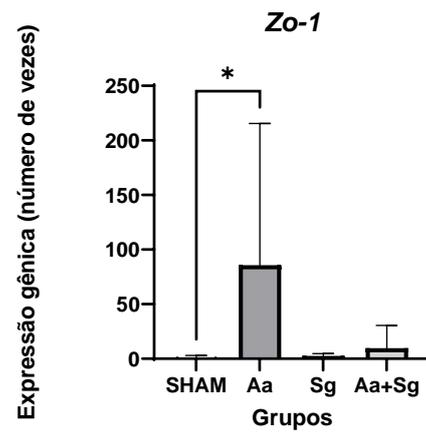
Fonte: A autora.

Foi também analisada a expressão de genes que codificam as proteínas de tight junction (TJ) claudina 1 (*Cldn*), e ocludina (*Occl*), além do gene que codifica a proteína de ancoragem zonulina 1 (*Zo1*), relacionadas à barreira intestinal. Os dados revelaram que o grupo infectado apenas por *A. actinomycetemcomitans* (Aa) apresentou regulação positiva da transcrição relativa dos genes pesquisados, quando comparados demais. A administração de *S. gordonii* também induziu regulação positiva da transcrição relativa de *Cldn* e *Ocln*, enquanto a associação de *A. actinomycetemcomitans* e *S. gordonii* não alterou o perfil de transcrição dos genes avaliados, apresentado níveis de transcritos semelhantes aos observados no grupo não infectado experimentalmente (SHAM). Os resultados da expressão relativa (após normalização com o controle endógeno *Gapdh*) de cada gene alvo estão apresentados em número de vezes (fold changes) em relação ao controle negativo (SHAM) nas figuras 4.4 A, B e C.

Figura 4.4 – Expressão gênica relativa de *Cldn 1* (A), *Ocln* (B) e *Zo1* (C), expressa em número de vezes em relação ao controle negativo (SHAM), determinada por RT-qPCR em intestino de camundongos C57BL/6 após o período experimental de 30 dias dos seguintes grupos: SHAM (controle negativo não infectado), Aa (com administração de *A. atinomycescomitans* via oral e por injeções palatinas), Sg (com administração de *S. gordonii* via oral) e Aa + Sg (com administração de *S. gordonii* via oral e administração de *A. atinomycescomitans* via oral e por injeções palatinas). ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, * $p < 0,05\%$



C

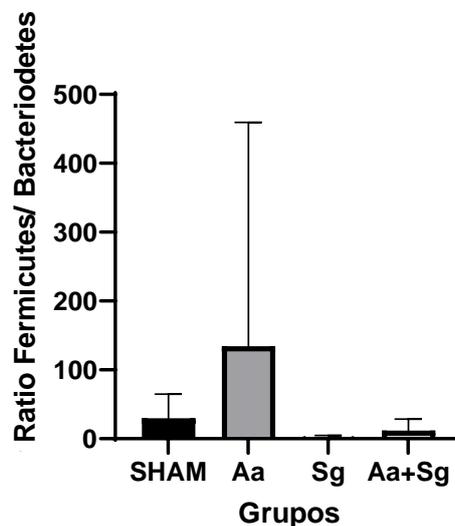


Fonte: A autora.

Análise em PCR em tempo real da Proporção *Firmicutes/Bacteroidetes* do conteúdo intestinal

Foram realizadas as análises da proporção de *Firmicutes/Bacteroidetes* nas amostras de conteúdo intestinal através do PCR em tempo real, com o intuito de analisar a disbiose na microbiota intestinal. Como podemos ver na figura 4.5, não houve diferença estatística entre os grupos do presente estudo.

Figura 4.5 – Proporção *Firmicutes/Bacteroidetes* do conteúdo intestinal dos grupos SHAM (controle negativo não infectado), Aa (com administração de *A. actinomycetemcomitans* via oral e por injeções palatinas), Sg (com administração de *S. gordonii* via oral) e Aa + Sg (com administração de *S. gordonii* via oral e administração de *A. actinomycetemcomitans* via oral e por injeções palatinas). ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, * $p < 0,05\%$. Determinada por RT-qPCR em intestino de camundongos C57BL/6 após o período experimental de 30 dias

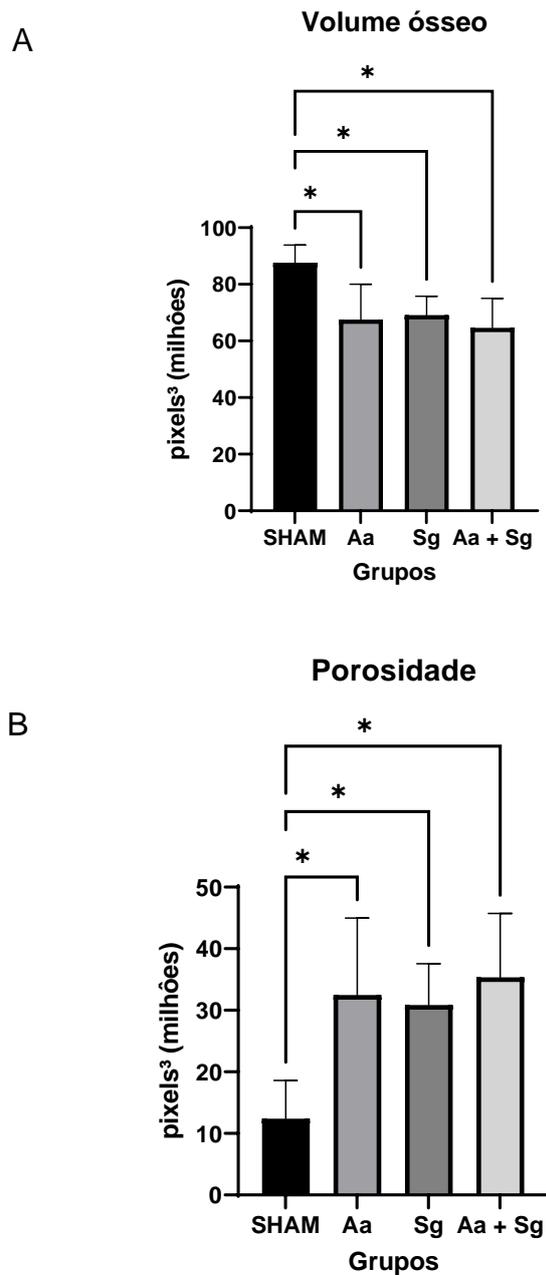


Fonte: A autora.

Perda óssea alveolar microtomografia computadorizada (MICROCT)

A análise da perda óssea alveolar foi realizada pela estimativa do volume ósseo e da porosidade óssea da hemimaxila esquerda dos animais, na região interproximal entre o primeiro e o segundo molar por Microtomografia computadorizada (MicroCT). Os dados indicaram que o modelo experimental para indução de periodontite foi bem-sucedido, com diferença estatisticamente significativa no volume ósseo e na porosidade entre os grupos SHAM e os demais (ANOVA, comparação múltipla de Tukey, $p < 0,05\%$). No entanto, a administração de *S. gordonii* também levou à perda óssea alveolar, como demonstrado pelos dados de volume ósseo e porosidade, enquanto a administração concomitante de *A. atinomycescomitans* e *S. gordonii* não induziu a maior perda óssea do que a administração de *A. atinomycescomitans* ou *S. gordonii* isoladamente. A representação gráfica dos dados médios de volume ósseo e porosidade estão apresentados nas figura 4.6 A e B respectivamente

Figura 4.6 - Dados médios e desvio padrão de volume ósseo (pixels³) (em A) e porosidade óssea (pixels³) (em B) da região interproximal entre o primeiro e o segundo molar (área de 60 x 30 pixels³, corte coronal) da hemimaxila direita de camundongos C57BL/6 após o período experimental de 30 dias dos seguintes grupos: SHAM (controle negativo não infectado), Aa (com administração de *A. actinomycetemcomitans* via oral e por injeções palatinas), Sg (com administração de *S. gordonii* via oral) e Aa + Sg (com administração de *S. gordonii* via oral e administração de *A. actinomycetemcomitans* via oral e por injeções palatinas). ANOVA, comparação Múltipla de Tukey, * p <0,05%



Fonte: A autora.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo investigamos os efeitos de *A.actinomycescomitans* sobre alguns fatores relacionados à homeostase intestinal. Além disso, desde que a interação de *A.actinomycescomitans* com *S. gordonii* poderia favorecer a sobrevivência e alterar a transcrição de alguns fatores de virulência do patógeno, como proposto por Stacy et al. (2016), investigamos se a associação de *A. actinomycescomitans* com *S. gordonii* poderia aumentar as chances de sobrevivência de *A. actinomycescomitans* na cavidade oral de camundongos, bem como avaliamos seus efeitos sobre alguns parâmetros no intestino.

A. actinomycescomitans é implicado na periodontite agressiva, mas também foi envolvido em uma variedade de doenças sistêmicas como endocardite infecciosa, abscessos cerebrais e torácicos (Fine et al., 2019) e artrite reumatóide (Konig et al., 2016). Atualmente sua associação com a periodontite não é compreendida como este sendo o agente etiológico da doença, mas sim como sendo um componente necessário de um consórcio microbiano relacionado à doença. Este organismo apresenta adesinas como Aae e OMP100, que permitem a sua ligação ao epitélio bucal. Além disso, apresenta OMP29, que participa da internalização em células epiteliais gengivais (Kajiya et al., 2011) e inibe a produção de CXCL-8 (da Silva MP et al., 2022). Também apresenta capacidade de modular a resposta imune pela produção de duas exotoxinas, a toxina distensora citoletal e a leucotoxina (Fine et al., 2019).

A.actinomycescomitans participa do biofilme dental pela adesão a superfícies abióticas mediada pelos produtos dos genes *flp*, *tad*, and *rcp*, mas também por co-agregar com outros microrganismos do biofilme dental (Fine et al., 2019). Além da co-agregação a outros microrganismos do biofilme, *A. actinomycescomitans* depende de outros organismos pela utilização preferencial de lactato como fonte de carbono, oriundo do metabolismo de bactérias produtoras, como *Streptococcus*. Esta preferência propicia que, ao se associar aos organismos produtores de lactato, *A.actinomycescomitans* tenha maiores chances de sobreviver, por limitar a

competição pela glicose como fonte de carbono com espécies pioneiras na colonização do biofilme (Fine et al., 2019). Por outro lado, certos *Streptococcus*, como *S. gordonii*, produzem elementos tóxicos como H₂O₂, que induz à regulação positiva da transcrição de genes como *kata*, *apiA* e *dspB*, codificando catalase, Omp100 e dispersina B, respectivamente, visando a proteção de *A.actinomycescomitans* dos efeitos destrutivos da H₂O₂, e potencializando a persistência do patógeno no biofilme dental (Stacy et al., 2014). Assim, modelos *in vitro* e *in vivo* sugeriram que a associação de *A.actinomycescomitans* com *Streptococcus* favoreceriam a colonização e virulência do patógeno (Ramsey, 2011; Stacy et al., 2014). Ainda, em macacos Rhesus foi sugerido que produtores de lactato como *Streptococcus*, *Leptotrichia*, e *Abiotrophia*, além de *Veillonella* que requer lactato para seu metabolismo, seriam associados com a colonização por *A.actinomycescomitans* produtor de altos níveis de leucotoxina (clone JP2) (Fine et al., 2019). Além disso, estudo em humanos mostrou que a associação entre *A.actinomycescomitans*, *S. parasanguinis* e *Filifactor alocis* relaciona-se com a progressão da perda óssea em adolescentes (Fine et al., 2013), sendo que *S. parasanguinis* apresenta fisiologia semelhante a *S. gordonii* na produção de H₂O₂ e lactato (Fine et al., 2019).

Porém, ao contrário do esperado, os dados do presente estudo indicam que a inoculação oral de *A. actinomycescomitans* em associação com *S. gordonii* não induziu a colonização persistente determinada por qPCR em amostras de biofilme oral e intestino, em camundongos de linhagem C57 BL/6. Deve-se ressaltar que, neste estudo, a inoculação de *A. actinomycescomitans* foi realizada não somente por meio de gavagem na cavidade oral, mas também pela injeção no palato. Estes dados contrastam com os descritos por Garlet et al. (2006) que demonstraram que camundongos da linhagem C57BL/6 inoculados via oral com 1×10^9 CFU de *A. actinomycescomitans* JP2 por três vezes em intervalos de 48h apresentavam níveis de *A. actinomycescomitans* que aumentavam nos tecidos periodontais até 7 dias após a inoculação e permaneciam estáveis por até 60 dias. Os mesmos autores mostraram que os níveis de *A. actinomycescomitans* aumentaram nos tecidos periodontais até 7 dias após a inoculação e permaneceram estáveis durante 60 dias.

Os resultados distintos podem ser devidos ao tipo de amostra analisado, pois no presente estudo analisamos amostras de biofilme dental e não tecido gengival. Por outro lado, nossos resultados estão de acordo com outros estudos que demonstraram que a administração oral de 3×10^9 UFC de *A. actinomycetemcomitans* por 5 vezes em intervalos de 1 dia também não resultaram na colonização persistente da espécie na cavidade oral de camundongos (Izawa et al., 2014). Um dos fatores que dificultam a persistência e virulência de *A. actinomycetemcomitans* em camundongos refere-se à especificidade de seus fatores de virulência. As suas adesinas Aae e OMP100 permitem a adesão de *A. actinomycetemcomitans* ao epitélio de humanos e alguns primatas, mas não às células epiteliais de outros mamíferos (Fine DH et al., 2007; Yue et al., 2007). Além disso, o principal fator de evasão de defesas do hospedeiro, a leucotoxina é específica para neutrófilos e monócitos de humanos e de alguns primatas do velho mundo (Tsai et al., 2018). Assim, o fato de utilizarmos a cepa JP2 de reconhecida maior virulência (Haubek et al., 2008) não é justificada pela sua maior produção de leucotoxina, mas outros fatores diferindo o clone JP2 das demais amostras do sorotipo b poderiam contribuir para o seu potencial patogênico (Huang et al., 2013).

Apesar da ausência de colonização persistente no biofilme oral, a administração de *A. actinomycetemcomitans* por injeção palatina resultou em perda óssea alveolar como descrito por vários autores (Garlet et al., 2006; Trombone et al., 2009; Garlet et al., 2010). Mas não podemos estimar se houve um efeito adicional da administração da espécie por via oral em relação a injeção palatina, porque não utilizamos grupo adicionais apenas com uma das vias de administração, visando minimizar o uso de animais.

Em conflito com estudo *in vivo* em modelo de abscesso (Stacy et al., 2016), a administração de *A. actinomycetemcomitans* com *S. gordonii* não induziu à maior perda óssea alveolar ou garantiu a persistência do patógeno no biofilme oral do que a administração apenas de *A. actinomycetemcomitans*. *S. gordonii* proveria lactato para nutrição, e aumentaria seu potencial de virulência, pela produção de H_2O_2 (Stacy et al., 2016), visto que o stress oxidativo regula positivamente a produção de leucotoxina e da

adesina ApiA (Fine et al 2019). No entanto, como descrito anteriormente, esta toxina e esta adesina tem especificidade para células de humanos e de alguns primatas (Yue et al. 2007; Fine et al., 2019), não tendo assim relevância no potencial patogênico da espécie em modelo murino. Além disso, embora *S. gordonii* possa aumentar a sobrevivência de *A.actinomycescomitans* em modelo de abscesso, a produção de H₂O₂ por esta espécie poderia atenuar a resposta inflamatória induzida pelo patógeno, um fator relevante na formação do microbioma oral disbiótico característico da periodontite. Estudo recente demonstrou que a H₂O₂ produzida por estreptococos ativa a via Nrf2 em macrófagos, que por sua vez inibe o fator de transcrição NFκB, levando à redução da produção de citocinas pro-inflamatórias (Tang et al., 2022). Esta informação, se somada aos nossos dados de transcrição gênica no intestino, onde a expressão de *Il-1β* (diferença não significativa) e de *Il10* foi regulada positivamente nos animais administrados apenas com *A.actinomycescomitans* quando comparados com animais do grupo *A.actinomycescomitans* + *S. gordonii*, poderia explicar a ausência de diferença entre os grupos *A.actinomycescomitans* e *A.actinomycescomitans* + *S. gordonii* quanto à perda óssea alveolar. Deve também ser considerado que a perda óssea alveolar é resultado de atividade sinérgica de uma comunidade microbiana, cujos diferentes membros poderiam ser afetados pela ação do peróxido de hidrogênio, particularmente as espécies anaeróbias estritas (Herrero, et al 2016). Assim, outros fatores relacionados a alterações no microbioma devido à inoculação de uma ou ambas as espécies poderiam ter influenciado os resultados, e maiores estudos são necessários.

Por outro lado, pudemos observar também perda óssea alveolar induzida pela administração apenas de *S. gordonii*. Embora este microrganismo seja considerado um comensal, encontrado na cavidade bucal, trato respiratório superior, intestino e pele, *S. gordonii* é um patógeno oportunista ao invadir a corrente sanguínea, como na sua associação com a endocardite bacteriana. Além disso, seu potencial patogênico aos tecidos periodontais pode ser possível, devido à sua associação com a periodontite apical (Park et al., 2020). Este agente é capaz de induzir resposta inflamatória devido ao reconhecimento de componentes pelas células do hospedeiro envolvidos na

virulência e imunorregulação (Park et al., 2020). A adesina rica em serina de *S. gordonii* é reconhecida e induz a maturação de células dendríticas (Ko et al., 2017) e suas glicoproteínas de parede aderem a plaquetas (Takamatsu et al., 2005). *S. gordonii* induz a produção de quimiocinas como CXCL8 por fibroblastos do ligamento periodontal (Takamatsu et al., 2005) e células endoteliais (Vernier et al., 1996). Além disso, *S. gordonii* é capaz de ativar osteoclastos e inibir a atividade de osteoblastos, indicando sua capacidade de indução de reabsorção óssea (Park et al., 2019). Embora não tenhamos detectado outros estudos experimentais sobre a capacidade de *S. gordonii* induzir perda óssea alveolar em modelo de periodontite, nossos dados indicaram que a inoculação oral frequente de altas doses de *S. gordonii* nos camundongos resultou em perda óssea alveolar. Além disso, no presente estudo o efeito da infecção por *A. actinomycetemcomitans* e/ ou *S. gordonii* foi avaliado sob vários parâmetros, mas não houve diferença entre os grupos quanto à pelagem, locomoção ou ganho de peso, sugerindo que o agente não promoveu severos efeitos sistêmicos.

A análise da literatura indica que pouco se conhece sobre o papel de *A. actinomycetemcomitans* ou de *S. gordonii* como indutores de disbiose intestinal e alteração da barreira intestinal. O postulado mais aceito atualmente indica que a desregulação da barreira mucosa facilita o acesso dos antígenos bacterianos presentes no lúmen intestinal através do epitélio, o que induz a ativação imune resultando em inflamação (Chichlowski; Hale, 2008; Capaldo; Nusrat, 2009), além de permitir a translocação de nutrientes e mesmo de patógenos (Suzuki, 2013).

A disbiose da microbiota intestinal foi anteriormente associada à endotoxemia em diferentes condições (Cani et al., 2008), enquanto a disbiose induzida por probióticos melhora o diabetes em mecanismo associado à redução da endotoxemia (Cani et al., 2007). Na periodontite também já foi observada disbiose, não só na cavidade oral, mas também no intestino (Lourenço et al., 2018; Amado et al., 2020; Kawamoto et al., 2021). Um dos indicadores de disbiose seria a alteração da proporção dos filos dominantes no intestino, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. Por exemplo, a obesidade é associada ao aumento da razão *Firmicutes/Bacteroidetes* na microbiota

intestinal (Amyot et al., 2012), e medidas de controle do peso promovem alterações no microbioma intestinal, incluindo alterações no rateio *Firmicutes*:*Bacteroidetes* (Crovesy et al., 2017; Barathikannan et al., 2019). Em termos gerais, a proporção de *Firmicutes* para *Bacteroidetes* é considerada de relevância significativa na composição da microbiota intestinal humana, como por exemplo, em idosos há uma redução no número e na diversidade de *Bacteroidetes*, considerados anaeróbios comensais protetores (Ley et al., 2006). A microbiota intestinal de pacientes com periodontite apresenta evidências de disbiose, embora não tenham sido detectadas alterações na proporção de bactérias pertencentes aos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* em humanos com periodontite em relação ao controle com periodonto saudável (Amado et al 2020; Lorenzo et al., 2018; Kawamoto et al., 2021). No entanto, a administração experimental de *P. gingivalis* em modelo murino resulta em aumento da proporção de *Bacteroidetes* e diminuição de *Firmicutes* (Nakajima et al., 2015a). Nossos dados com a administração oral de *A.actinomycescomitans* indicam tendência de maior abundância de *Firmicutes*, sem diferença estatística com o controle não infectado. Portanto, não pudemos inferir se *A.actinomycescomitans* induziu a disbiose intestinal. No entanto, este estudo analisou apenas as proporções destes filos, e esta não é capaz de detectar alterações no microbioma intestinal a nível taxonômico mais baixo do que o de filo induzidas por *A.actinomycescomitans*.

Por outro lado, pudemos observar que a expressão de proteínas *tight junction* (TJ) como ocludina, claudina 1 e zoonulina 1 apresentou regulação positiva com a administração de *A.actinomycescomitans*, e *S. gordonii* isoladamente, enquanto a associação das duas espécies regulou positivamente, em menor grau, apenas ocludina, enquanto claudina 1 foi regulada negativamente. Além disso, a infecção por *A.actinomycescomitans* também induziu regulação positiva de zonulina 1. Estes dados sugerem que a administração dos agentes levou a desregulação da expressão das proteínas *tight junction*.

Estes dados estão parcialmente de acordo com os resultados obtidos quando analisamos os níveis séricos de LPS nos animais dos diferentes grupos. Embora as diferenças entre os grupos não tenham sido significantes, os níveis séricos de LPS nos

animais que receberam *A.actinomycescomitans*, sozinho ou em combinação com *S.gordonii*, foram maiores do que os observados nos demais grupos. A presença de LPS no soro pode ser um indicativo de maior permeabilidade da mucosa intestinal, e pode ter relação com a expressão das proteínas TJs, pois estas são envolvidas na permeabilidade intestinal via paracelular, ou seja, regulam o transporte através da mucosa que ocorre no espaço intercelular entre células epiteliais adjacentes (Suzuki, 2013). Além disso, analisamos a expressão da citocina pró-inflamatória IL1 β e de IL-10. Esta análise justifica-se porque as proteínas *tight junctions* são reguladas por citocinas (Nusrat et al., 2000).

Alterações na expressão das proteínas *tight junctions* poderiam promover aumento da permeabilidade intestinal, fazendo com que produtos bacterianos como o LPS ultrapassem a barreira intestinal e induzam a inflamação de baixo grau (Cani et al., 2007; Tsumoko et al., 2007). A desregulação da expressão de proteínas *tight junctions* ocorre em certas condições de quebra da integridade da barreira como obesidade (Hodin et al., 2011), esteatose hepática (Brun et al., 2007), inflamação intestinal como doença de Chron (Chichlowski M, Hale LP., 2008) e outras condições. O LPS circulante induz resposta inflamatória mediada por TLR4 e por proteínas acessórias como a proteína ligante de LPS (LPB), CD14 e MD2 (Hayashi et al., 2003), associada à estas condições.

Outros estudos também mostraram que o LPS poderia ser transportado através da barreira intestinal de enterócitos não só devido ao aumento de permeabilidade paracelular, mas também por mecanismos transcelulares dependentes de TLR (Cario E et al., 2000; Neal et al., 2006). Estudos em células epiteliais gengivais mostraram que a infecção por *A.actinomycescomitans* induz o aumento da expressão de TLR4 (Bueno et al., 2022), mas não foi ainda descrito o efeito de *A.actinomycescomitans* sobre enterócitos.

Pudemos observar que tanto a infecção por *A.actinomycescomitans* como por *S. gordonii* levou a superexpressão de ocludina. Ocludina é uma proteína TJ que parece criar uma barreira contra macromoléculas, mas não contra íons (Suzuki 2013). Ocludina é um componente central do complexo *tighjunction* que liga células epiteliais

vizinhas e regula a polaridade celular, é também responsável pela cicatrização de feridas epiteliais e na modulação de transdução de sinal (Meredith et al., 2012). Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a ocludina está relacionada à regulação do fluxo macromolecular paracelular no estado estacionário e em resposta ao fator de necrose tumoral (Buschmann et al., 2013). Nossos dados indicaram que o grupo infectado apenas por *A.actinomycescomitans* apresentou regulação positiva da expressão de ocludina quando comparado aos demais. A administração de *S. gordonii* também induziu regulação positiva, enquanto a associação de *A.actinomycescomitans* e *S. gordonii* não alterou o perfil de expressão de ocludina, apresentando níveis semelhantes aos observados no grupo não infectado experimentalmente (SHAM). A super expressão de ocludina induzida por *S. gordonii* não é surpreendente, pois a produção de H₂O₂ por esta espécie poderia ter um efeito benéfico sobre a integridade intestinal no modelo experimental (Chi et al., 2015). Este resultado está de acordo com a redução (não significativa) dos níveis séricos de LPS observada nos animais do grupo *S. gordonii*, quando comparado ao grupo *A.actinomycescomitans* e *S. gordonii* eno, e a menor resposta de expressão de *Il1β* e *Il-10* observada neste grupo. No entanto, deve ser considerado que os níveis de expressão de ocludina acima dos basais poderiam afetar negativamente a função de barreira da mucosa intestinal.

Além disso, pudemos observar que a infecção por *A.actinomycescomitans* levou à regulação positiva da expressão de Claudinas 1. A família das Claudinas é formada por 24 membros de proteínas transmembrana, sendo que estas podem ser divididas em dois tipos: aquelas envolvidas na formação da barreira (diminuindo a permeabilidade paracelular) e aquelas participando da formação de canais de poros (aumentando a permeabilidade paracelular). Claudina 1 é categorizada entre aquelas TJs que formam a barreira, bloqueando a permeabilidade a moléculas carregadas e não carregadas. (Suzuki. 2013). Apesar de claudina 1 ser um constituinte do complexo TJ, a sua superexpressão foi associada a cancer de cólon (Dhawan et al., 2005), e a áreas de inflamação ativa associadas à transformação neoplásica em pacientes com doença inflamatória intestinal (IBD) (Weber et al., 2008; Kinugasa et al., 2010). Esta associação de maior expressão de claudina 1 com inflamação também foi sugerida

pelo presente estudo. Apesar de não terem sido avaliados os níveis de mediadores inflamatórios no intestino, os nossos dados de expressão gênica sugerem que *A.actinomycescomitans* induziu não somente a superexpressão de claudina 1 mas também a inflamação no jejuno, visto que os níveis de transcrição de *Il-18* e *Il-10* apresentaram-se aumentados no grupo que recebeu apenas o patógeno. Estes dados estão de acordo com o estudo de Pope et al. (2014), utilizando camundongos transgênicos superexpressando CLD1(CI-1Tg) humano. Este estudo mostrou o papel de claudina 1 na regulação da sinalização Notch, na diferenciação epitelial e na inflamação da mucosa. Camundongos CI-1Tg apresentaram ativação imune constante e inflamação intestinal, e, mesmo quando o agente ativador da inflamação foi removido (dextran sulfato), o reparo da mucosa foi comprometido e houve aumento da permeabilidade trans-mucosa intestinal em relação aos camundongos selvagem. Estudos mais recentes confirmaram o efeito da superexpressão de claudina 1 na inflamação da mucosa e defeitos na homeostase epitelial, sendo estes fenômenos acompanhados de aumento na suscetibilidade à colite e ao cancer associado à colite nos animais Cld-1Tg em relação aos camundongos selvagem (Gowrikumar et al., 2019). É interessante notar que a toxina distensora citoletal de *Helicobacter hepaticus* também foi associada a alterações displásicas no fígado, em modelo experimental murino (Ge et al., 2017.). Tendo em vista que *A.actinomycescomitans* é um organismo produtor de CDT, outros estudos deveriam ser realizados para avaliar seu potencial carcinogênico. CDT leva a parada do ciclo células em G2/M e apoptose de muitos tipos de células alvo, inclusive células epiteliais, e foi associada à infecção persistente com aumento da inflamação (Kailoo S et al., 2021). É uma toxina única por induzir quebras no DNA de dupla fita, com homologia à DNase I de mamíferos, sendo considerada uma toxina genotóxica. No epitélio gengival, CDT desadere a camada queratinizada externa, distendendo as células basais e dissolvendo as junções celulares (Damek-Poprawa et al., 2021). Outros estudos, com AaCDT purificada poderiam mostrar se esta toxina seria associada ao aumento da expressão de proteínas TJs, particularmente de claudina 1, aumentando a permeabilidade da barreira do epitélio intestinal.

Zo-1, uma das proteínas ZO mais conhecidas (Suzuki et al) foi superexpressa no intestino dos animais infectados por *A.actinomycescomitans*, e em menor grau pela associação *A.actinomycescomitans* + *S. gordonii*. As proteínas ZO (zonula occludens) são proteínas citosólicas que interagem com os domínios intracelulares das proteínas transmembranas TJs, ancorando-as a um anel prejunctional de actinmiosina e implicadas na regulação da formação das tight junctions (Suzuki, 2013). *A.actinomycescomitans* induziu a regulação positiva de Zo1. Mas, a associação de *A.actinomycescomitans* e *S gordonii* não alterou o perfil de transcrição de *Occln* e *Zo1*, apresentando níveis de transcritos semelhantes aos observados no grupo não infectado experimentalmente (SHAM). Estes dados indicam atenuação da resposta inflamatória no intestino e na transcrição de *Occln* e *Zo1* quando o grupo *A.actinomycescomitans* + *S. gordonii* foi comparado ao grupo *A.actinomycescomitans*, sugerindo efeito benéfico da associação das duas bactérias sobre a barreira intestinal (Chi et al., 2015), bem como sobre a resposta inflamatória (Tang et al 2022). No entanto, a redução na transcrição de Claudina 1 neste grupo poderia representar um aspecto negativo à função da barreira induzida pela associação dos agentes.

A expressão das proteínas *tight junction* é essencial para a manutenção da saúde. Assim, uma análise inicial poderia indicar conflito dos nossos resultados com os obtidos em análises sobre os mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos de probióticos (Anderson et al., 2010; Wang et al., 2018), que incluem a regulação positiva da expressão de TJs. Em estudo em modelo animal de colite ulcerativa induzida por dextran, Dou et al. (2021) observaram que a administração de *L. casei* ATCC 393 melhorava o quadro de colite nos animais e que este efeito era associado à redução da expressão de mediadores inflamatórios como IL-1 β e ao aumento da expressão de ocludina, Zo-1 e claudina1 na mucosa intestinal (Dou et al., 2021). Utilizando *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) em modelo murino para aumentar a permeabilidade intestinal, Wang et al. (2018) observaram que o probiótico *Lactobacillus plantarum* cepa ZLP001 foi capaz de aliviar a redução na quantidade de proteínas TJ (claudina 1, ocludina e ZO-1) e regular negativamente a expressão de

citocinas pró-inflamatórias, em mecanismo associado a alteração do microbioma intestinal, principalmente devido a maior abundância de bactérias produtoras de butirato. Então, podemos concluir que o efeito benéfico de probióticos não é devido a superexpressão das TJs, pois os dados indicam que os níveis de mRNA de claudina1, ocludina e Zo-1 induzidos pela cepa probiótica nos animais desafiados com ETEC foram semelhantes aos observados nos animais controles não infectados (Wang et al, 2018). Assim, os resultados aqui apresentados indicam que *A. actinomycetemcomitans* promove uma desregulação da expressão de proteínas TJs, que levaria a danos na barreira intestinal, associado a maior expressão de IL-1 β e IL-10, sugerindo um quadro inflamatório.

A expressão das proteínas tight junction é dependente da produção de ácidos graxos de cadeia curta. *A. actinomycetemcomitans* apresenta metabolismo anaeróbico, mas pode ter metabolismo aeróbico quando há produção de H₂O₂ por *S. gordonii* (Stacy et al., 2014). Sabe-se que o intestino apresenta condições anaeróbicas, e assim, mesmo como transitório, *A. actinomycetemcomitans* teria possivelmente metabolismo anaeróbico, com produção de formato, acetato e succinato enquanto em ambiente aeróbico observa-se principalmente a produção de lactato (Ramsey et al., 2011). Assim, seria possível que a diferença de produtos finais de *A. actinomycetemcomitans* na presença e ausência de *S. gordonii* fosse parcialmente responsável pelas diferenças na alteração na barreira intestinal observada nos dois grupos experimentais.

A infecção por *A. actinomycetemcomitans* foi associada também com a regulação positiva de IL-1 β no intestino, embora não tenha sido detectada diferença significativa na expressão desta citocina entre os grupos avaliados. Estudos prévios mostraram que o modelo de infecção com *A. actinomycetemcomitans* e com *A. actinomycetemcomitans* + *S. gordonii* levou a maior expressão de IL-1 β nos tecidos gengivais (Bueno tese de doutorado, 2022). *A. actinomycetemcomitans* é capaz de induzir inflamassoma e a produção de IL-1 β por macrófagos (Ando- Suguimoto et al., 2014). Além disso, AaCDT é capaz de ativar o inflamassoma e induzir a produção de IL-1 β (Shenker et al., 2014). IL-1 β é uma citocina associada não somente à periodontite, mas níveis elevados de IL-1 β foram associados à doença inflamatória intestinal, e sua produção foi associada à

severidade desta doença, embora alguns estudos sugiram seu efeito protetor contra a colite (Zhen e Zhang, 2019). Estudos indicam que a produção de *IL-1 β* no intestino está associada a maior permeabilidade intestinal (Suzuki 2013). Em células Caco2 (epiteliais intestinais), *IL-1 β* resultou em redução da transcrição de *Occln*, que codifica ocludina (Al-Sadi, Ma, 2007). Assim, a expressão de *IL-1 β* induzida nos animais administrados com *A.actinomycescomitans* corrobora com os dados de intensa alteração no perfil transcricional de proteínas TJ no intestino destes animais, sugerindo inflamação associada à perda de integridade da barreira intestinal.

Também pudemos observar regulação positiva de *IL-10* nos animais infectados por *A.actinomycescomitans*. A citocina *IL-10* possui um papel importante na regulação do curso da infecção, com intuito de evitar uma atividade inflamatória excessiva e resultante de dano tecidual. As células T constituem uma fonte não redundante de *IL-10* em muitos casos, embora *IL-10* seja produzida por praticamente todas as células do sistema imunológico inato e adaptativo (Bedke et al., 2019). Apesar de reconhecida como anti-inflamatória esta citocina apresenta também propriedades pró-inflamatórias. *IL-10* foi testada em vários ensaios clínicos para o tratamento de doenças autoimunes e câncer (Yang et al., 2017) e é um importante regulador da homeostase óssea alveolar nas doenças líticas ósseas orais, tais como periodontite e lesões periapicais (Claudino et al., 2010; de Rossi et al., 2008; Zhang et al., 2006). Esta citocina inibe a formação de osteoclastos (Xu et al., 2005), mas poderia também inibir diretamente a osteoclastogênese (Evans et al., 2007; Lovibond et al., 2003) por reduzir a expressão do fator nuclear de células T ativadas (NFAT) c1 (Evans et al., 2007; Mohamed et al., 2007).

In vivo, *IL-10* é um importante supressor endógeno da reabsorção óssea estimulada (Sasaki et al., 2010). Van Vlasselaer e colaboradores (1994) sugeriram que a *IL-10* desregula os primeiros passos da diferenciação osteogênica em células da medula óssea murina através da inibição da produção do fator de crescimento transformador-beta 1 (TGF- β 1). Os efeitos inibidores nas fases iniciais da diferenciação osteogênica podem ser eventualmente neutralizados pela desregulação de citocinas

inflamatórias de infecção, tais como TNF- α , concluindo que *IL-10* aumenta eventualmente a diferenciação osteoblástica (Zhang et al., 2014).

Apesar deste papel protetor, nossos dados indicam que a infecção por *A.actinomycescomitans*, regulou positivamente *IL-10* no intestino. No curso de uma infecção, a resposta inflamatória exacerbada pode ser destrutiva, e *IL-10* é expressa quando há necessidade de limitar a inflamação e o consequente dano tecidual (Neumann et al., 2019). Por outro lado, *IL-10* pode evitar a eliminação do patógeno e favorecer a cronicidade das doenças infecciosas. Entre seus mecanismos destaca-se a inibição direta da expansão de células Th17, e a promoção de proliferação de células B ativadas e a produção de IgA. No intestino *IL-10* é crítica para a manutenção da função de barreira, e animais que não produzem *IL-10* tem a permeabilidade epitelial aumentada. Assim, associados a maior expressão de *IL-1 β* , os dados sugerem que a regulação positiva de *IL-10* no intestino teria como objetivo limitar o quadro inflamatório induzido pela infecção por *A. actinomycescomitans* (Neumann et al., 2019).

A relação entre *A.actinomycescomitans* e alterações intestinais não surpreende. A periodontite já foi associada à doença inflamatória crônica do intestino (IBD) e ao cancer de cólon (Lauritano et al., 2017). É interessante notar também que em pacientes com Periodontite padrão molar-incisivo, onde *A.actinomycescomitans* apresenta níveis subgingivais 50 X mais elevados do que pacientes saudáveis, o microbioma intestinal foi associado à disbiose. Nestes indivíduos com periodontite padrão molar-incisivo, o microbioma fecal apresentou maior abundância de bactérias redutoras de sulfato (SRB) (Amado et al., 2020), sendo que a maior abundância destas bactérias é considerada um fator de risco potencial para o cancer cólon retal (Fang et al., 2021).

Os dados apresentados indicam que *A.actinomycescomitans* é capaz de causar alterações no intestino, alterando a expressão de proteínas TJ e induzindo a inflamação. Pudemos também demonstrar que a associação de *A.actinomycescomitans* com *S. gordonii* não resulta em maior severidade da periodontite do que a administração oral de *A.actinomycescomitans* isoladamente. Além disso, a associação com *S. gordonii* parece atenuar os efeitos promovidos por

A.actinomycescomitans no intestino. Os mecanismos pelos quais *A.actinomycescomitans* induz as alterações aqui apresentadas ainda não foram esclarecidos. No entanto, estes dados abrem novas perspectivas no estudo das doenças periodontais associadas a *A.actinomycescomitans* e seus efeitos sistêmicos. Outros estudos, com diferentes associações de patógenos e períodos de administração do consórcio microbiano, e análises da função da barreira intestinal e seus efeitos sistêmicos são necessários para propiciar uma compreensão mais ampla da patofisiologia das doenças periodontais.

6 CONCLUSÃO

Levando em consideração as limitações do modelo experimental empregado, os resultados do presente estudo indicam que a associação de *A.actinomycescomitans* com *S.gordonii* frente à administração de *A.actinomycescomitans* isoladamente no modelo de infecção murino,

- não favoreceu a colonização persistente na cavidade oral ou no intestino por *A.actinomycescomitans*;
- induziu perda óssea alveolar similar.
- não resultou em alteração dos níveis séricos de LPS.

Por outro lado,

- A administração de *A.actinomycescomitans* isoladamente regulou positivamente a transcrição de IL-10 e resultou em tendência de regulação positiva de IL-1 β no intestino, sugerindo indução de quadro inflamatório pelo patógeno, enquanto a administração de *S.gordonii* associado a *A.actinomycescomitans* atenuou estes efeitos.;

- A administração de *A.actinomycescomitans* isoladamente regulou positivamente a transcrição de genes codificando proteínas que influenciam a permeabilidade do epitélio intestinal, como claudina 1, ocludina e zonulina 1, sugerindo alteração da função da barreira intestinal. No entanto, estes efeitos não foram observados quando a associação de *A.actinomycescomitans* com *S.gordonii* foi administrada aos animais.
- A administração de *A.actinomycescomitans* isoladamente tendeu a aumentar o rateio Firmicutes:Bacteroidetes na comunidade microbiana do intestino, sugerindo disbiose intestinal em alguns animais. No entanto, este efeito não foi observado quando a associação de *A.actinomycescomitans* com *S. gordonii* foi administrada aos animais.

Assim, os dados aqui apresentados sugerem que a inoculação experimental de *A.actinomycescomitans*, embora não induza a colonização persistente na cavidade oral e intestino, induz periodontite experimental e altera a homeostase intestinal. Além disso, a associação de *A.actinomycescomitans* com *S. gordonii* mantêm o potencial de induzir danos aos tecidos periodontais, mas a interação do patógeno com o organismo comensal modula os seus efeitos no intestino. Outros estudos são necessários para o entendimento dos efeitos e mecanismos induzidos pela microbiota oral patogênica, sobre o intestino.

REFERÊNCIAS¹

Ahmad R, Sorrell MF, Batra SK, Dhawan P, Singh AB. Gut permeability and mucosal inflammation: bad, good or context dependent. *Mucosal Immunol.* 2017 Mar;10(2):307-17. doi: 10.1038/mi.2016.128.

Al-Sadi RM, Ma TY. IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol.* 2007 Apr 1;178(7):4641-9. doi: 10.4049/jimmunol.178.7.4641. Albandar JM. Aggressive and acute periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2014 Jun;65(1):7-12. doi: 10.1111/prd.12013.

Amado PPP, Kawamoto D, Albuquerque-Souza E, Franco DC, Saraiva L, et al. Oral and Fecal Microbiome in Molar-Incisor Pattern Periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Oct 8;10:583761. doi: 10.3389/fcimb.2020.583761.

Amyot J, Semache M, Ferdaoussi M, Fontés G, Poitout V. Lipopolysaccharides impair insulin gene expression in isolated islets of Langerhans via Toll-Like Receptor-4 and NF- κ B signalling. *PLoS One.* 2012;7(4):e36200. doi: 10.1371/journal.pone.0036200.

Anderson JM. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol Sci.* 2001 Jun;16:126-30. doi: 10.1152/physiologyonline.2001.16.3.126.

Anderson RC, Cookson AL, McNabb WC, Park Z, McCann MJ, et al. *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiol.* 2010 Dec 9;10:316. doi: 10.1186/1471-2180-10-316.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Ando-Suguimoto ES, Benakanakere MR, Mayer MPA, Kinane DF. Distinct Signaling Pathways Between Human Macrophages and Primary Gingival Epithelial Cells by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Pathogens*. 2020 Mar 27;9(4):248. doi: 10.3390/pathogens9040248.

Ando-Sugimoto ES, da Silva MP, Kawamoto D, Chen C, DiRienzo JM, Mayer MPA. The cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* inhibits macrophage phagocytosis and subverts cytokine production. *Cytokine*. 2014 Mar;66(1):46-53. doi: 10.1016/j.cyto.2013.12.014.

Arimatsu K, Yamada H, Miyazawa H, Minagawa T, Nakajima M, Ryder MI, et al. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. *Sci Rep*. 2014 May 6;4:4828. doi: 10.1038/srep04828.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4(1):1-6. doi: 10.1902/annals.1999.4.1.1.

Arora T, Bäckhed F. The gut microbiota and metabolic disease: current understanding and future perspectives. *J Intern Med*. 2016 Oct;280(4):339-49. doi: 10.1111/joim.12508.

Asakawa R, Komatsuzawa H, Kawai T, Yamada S, Goncalves RB, Izumi S, et al. Outer membrane protein 100, a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol Microbiol*. 2003 Nov;50(4):1125-39. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03748.x.

Asikainen S, Alaluusua S, Kleemola-Kujala E. A 2-year follow-up on the clinical and microbiological conditions of periodontium in teenagers. *J Clin Periodontol*. 1991 Jan;18(1):16-9. doi: 10.1111/j.1600-051x.1991.tb01113.x.

Barathikannan K, Chelliah R, Rubab M, Daliri EB, Elahi F, Kim DH, et al. Gut Microbiome Modulation Based on Probiotic Application for Anti-Obesity: A Review on Efficacy and Validation. *Microorganisms*. 2019 Oct 16;7(10):456. doi: 10.3390/microorganisms7100456.

Bedke T, Muscate F, Soukou S, Gagliani N, Huber S. Title: IL-10-producing T cells and their dual functions. *Semin Immunol*. 2019 Aug;44:101335. doi: 10.1016/j.smim.2019.101335.

Berezow AB, Darveau RP. Microbial shift and periodontitis. *Periodontol 2000*. 2011 Feb;55(1):36-47. doi: 10.1111/j.1600-0757.2010.00350.x.

Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol.* 1993 May;64(5 Suppl):474-84. doi: 10.1902/jop.1993.64.5s.474.

Borgnakke WS, Ylöstalo PV, Taylor GW, Genco RJ. Effect of periodontal disease on diabetes: systematic review of epidemiologic observational evidence. *J Clin Periodontol.* 2013 Apr;40 Suppl 14:S135-52. doi: 10.1111/jcpe.12080.

Brígido JA, da Silveira VR, Rego RO, Nogueira NA. Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in relation to periodontal status and geographic origin of individuals-a review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2014 Mar 1;19(2):e184-91. doi: 10.4317/medoral.19304.

Brown SA, Whiteley M. A novel exclusion mechanism for carbon resource partitioning in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Bacteriol.* 2007 Sep;189(17):6407-14. doi: 10.1128/JB.00554-07.

Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palù G, et al. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 Feb;292(2):G518-25. doi: 10.1152/ajpgi.00024.2006.

Brunkwall L, Orho-Melander M. The gut microbiome as a target for prevention and treatment of hyperglycaemia in type 2 diabetes: from current human evidence to future possibilities. *Diabetologia.* 2017 Jun;60(6):943-51. doi: 10.1007/s00125-017-4278-3.

Bueno LC, Mayer MP, DiRienzo JM. Relationship between conversion of localized juvenile periodontitis-susceptible children from health to disease and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin promoter structure. *J Periodontol.* 1998 Sep;69(9):998-1007. doi: 10.1902/jop.1998.69.9.998. Erratum in: *J Periodontol* 1999 Jul;70(7):822.

Bueno-Silva B, Bueno MR, Kawamoto D, Casarin RC, Pingueiro JMS, Alencar SM. et al. A. Anti-Inflammatory Effects of (3 S)-Vestitol on Peritoneal Macrophages. *Pharmaceuticals.* 2022;15(5), 553. doi: [10.3390/ph15050553](https://doi.org/10.3390/ph15050553).

Buschmann MM, Shen L, Rajapakse H, Raleigh DR, Wang Y, Wang Y, et al. Occludin OCEL-domain interactions are required for maintenance and regulation of the tight junction barrier to macromolecular flux. *Mol Biol Cell*. 2013 Oct;24(19):3056-68. doi: 10.1091/mbc.E12-09-0688.

Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008 Jun;57(6):1470-81. doi: 10.2337/db07-1403.

Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*. 2007 Nov;50(11):2374-83. doi: 10.1007/s00125-007-0791-0.

Capaldo CT, Nusrat A. Cytokine regulation of tight junctions. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Apr;1788(4):864-71. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.08.027.

Caricilli AM, Picardi PK, de Abreu LL, Ueno M, Prada PO, Ropelle ER, et al. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. *PLoS Biol*. 2011 Dec;9(12):e1001212. doi: 10.1371/journal.pbio.1001212.

Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol*. 2000 Jan 15;164(2):966-72. doi: 10.4049/jimmunol.164.2.966.

Castillo DM, Sánchez-Beltrán MC, Castellanos JE, Sanz I, Mayorga-Fayad I, Sanz M, et al. Detection of specific periodontal microorganisms from bacteraemia samples after periodontal therapy using molecular-based diagnostics. *J Clin Periodontol*. 2011 May;38(5):418-27. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01717.x.

Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol*. 2018 Jun;89 Suppl 1:S1-S8. doi: 10.1002/JPER.18-0157.

Chang CS, Kokontis J, Liao ST. Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Oct;85(19):7211-5. doi: 10.1073/pnas.85.19.7211.

Chi X, Yao W, Xia H, Jin Y, Li X, Cai J, et al. Elevation of HO-1 Expression Mitigates Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury and Restores Tight Junction Function in a Rat Liver Transplantation Model. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:986075. doi: 10.1155/2015/986075.

Chichlowski M, Hale LP. Bacterial-mucosal interactions in inflammatory bowel disease: an alliance gone bad. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008 Dec;295(6):G1139-49. doi: 10.1152/ajpgi.90516.2008.

Claudino M, Garlet TP, Cardoso CR, de Assis GF, Taga R, Cunha FQ, et al. Down-regulation of expression of osteoblast and osteocyte markers in periodontal tissues associated with the spontaneous alveolar bone loss of interleukin-10 knockout mice. *Eur J Oral Sci*. 2010 Feb;118(1):19-28. doi: 10.1111/j.1600-0722.2009.00706.x.

Crovesy L, Ostrowski M, Ferreira DMTP, Rosado EL, Soares-Mota M. Effect of *Lactobacillus* on body weight and body fat in overweight subjects: A systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int J Obes (Lond)*. 2017 Nov;41(11):1607-14. doi: 10.1038/ijo.2017.161.

Damek-Poprawa M, Haris M, Volgina A, Korostoff J, DiRienzo JM. Cytotoxic distending toxin damages the oral epithelium of gingival explants. *J Dent Res*. 2011 Jul;90(7):874-9. doi: 10.1177/0022034511403743.

Dhawan P, Singh AB, Deane NG, No Y, Shiou SR, Schmidt C, et al. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest*. 2005 Jul;115(7):1765-76. doi: 10.1172/JCI24543.

de Pablo P, Chapple IL, Buckley CD, Dietrich T. Periodontitis in systemic rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2009 Apr;5(4):218-24. doi: 10.1038/nrrheum.2009.28.

De Rossi A, Rocha LB, Rossi MA. Interferon-gamma, interleukin-10, Intercellular adhesion molecule-1, and chemokine receptor 5, but not interleukin-4, attenuate the development of periapical lesions. *J Endod*. 2008 Jan;34(1):31-8. doi: 10.1016/j.joen.2007.09.021.

DiRienzo JM. Breaking the Gingival Epithelial Barrier: Role of the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Cytotoxic Distending Toxin in Oral Infectious Disease. *Cells*. 2014 May 23;3(2):476-99. doi: 10.3390/cells3020476.

Díaz-Zúñiga J, Muñoz Y, Melgar-Rodríguez S, More J, Bruna B, Lobos P, Monasterio G, Vernal R, Paula-Lima A. Serotype b of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* triggers pro-inflammatory responses and amyloid beta secretion in hippocampal cells: a novel link between periodontitis and Alzheimer's disease? *J Oral Microbiol*. 2019 Apr 15;11(1):1586423. doi: 10.1080/20002297.2019.1586423.

Díaz-Zúñiga J, Monasterio G, Alvarez C, Melgar-Rodríguez S, Benítez A, Ciuchi P, García M, Arias J, Sanz M, Vernal R. Variability of the dendritic cell response triggered by different serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* is toll-like receptor 2 (TLR2) or TLR4 dependent. *J Periodontol*. 2015 Jan;86(1):108-19. doi: 10.1902/jop.2014.140326.

Diehl V, Franklin J, Pfreundschuh M, Lathan B, Paulus U, Hasenclever D, et al. Standard and increased-dose BEACOPP chemotherapy compared with COPP-ABVD for advanced Hodgkin's disease. *N Engl J Med*. 2003 Jun 12;348(24):2386-95. doi: 10.1056/NEJMoa022473. Erratum in: *N Engl J Med*. 2005 Aug 18;353(7):744. Dosage error in article text.

Dietmann A, Millonig A, Combes V, Couraud PO, Kachlany SC, Grau GE. Effects of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin on endothelial cells. *Microb Pathog*. 2013 Aug-Sep;61-62:43-50. doi: 10.1016/j.micpath.2013.05.001.

Dou X, Qiao L, Chang J, Yan S, Song X, Chen Y, et al. *Lactobacillus casei* ATCC 393 and its metabolites alleviate dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis in mice through the NLRP3-(Caspase-1)/IL-1 β pathway. *Food Funct*. 2021 Nov 29;12(23):12022-35. doi: 10.1039/d1fo02405a.

Evans KE, Fox SW. Interleukin-10 inhibits osteoclastogenesis by reducing NFATc1 expression and preventing its translocation to the nucleus. *BMC Cell Biol*. 2007 Jan 19;8:4. doi: 10.1186/1471-2121-8-4.

Fang Y, Yan C, Zhao Q, Xu J, Liu Z, Gao J, et al. The roles of microbial products in the development of colorectal cancer: a review. *Bioengineered*. 2021 Dec;12(1):720-35. doi: 10.1080/21655979.2021.1889109.

Fine DH, Patil AG, Loos BG. Classification and diagnosis of aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45 Suppl 20:S95-S111. doi: 10.1111/jcpe.12942.

Fine DH, Armitage GC, Genco RJ, Griffen AL, Diehl SR. Unique etiologic, demographic, and pathologic characteristics of localized aggressive periodontitis support classification as a distinct subcategory of periodontitis. *J Am Dent Assoc*. 2019 Nov;150(11):922-31. doi: 10.1016/j.adaj.2019.07.024.

Fine DH, Markowitz K, Fairlie K, Tischio-Bereski D, Ferrendiz J, Furgang D, et al. A consortium of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus parasanguinis*, and *Filifactor alocis* is present in sites prior to bone loss in a longitudinal study of localized aggressive periodontitis. *J Clin Microbiol*. 2013 Sep;51(9):2850-61. doi: 10.1128/JCM.00729-13. Epub 2013 Jun 19.

Fine DH, Velliyagounder K, Furgang D, Kaplan JB. The *Actinobacillus actinomycetemcomitans* autotransporter adhesin Aae exhibits specificity for buccal epithelial cells from humans and old world primates. *Infect Immun*. 2005 Apr;73(4):1947-53. doi: 10.1128/IAI.73.4.1947-1953.2005.

Fives-Taylor P, Meyer D, Mintz K. Virulence Factors of the Periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol*. 1996 Mar;67 Suppl 3S:291-297. doi: 10.1902/jop.1996.67.3s.291.

Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol* 2000. 1999 Jun;20:136-67. doi: 10.1111/j.1600-0757.1999.tb00161.x. PMID: 10522226.

Garlet GP, Avila-Campos MJ, Milanezi CM, Ferreira BR, Silva JS. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. *Microbes Infect*. 2005 Apr;7(4):738-47. doi: 10.1016/j.micinf.2005.01.012.

Garlet GP, Cardoso CR, Mariano FS, Claudino M, de Assis GF, Campanelli AP, et al. Regulatory T cells attenuate experimental periodontitis progression in mice. *J Clin Periodontol*. 2010 Jul;37(7):591-600. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01586.x.

Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol*. 2006 Feb;21(1):12-20. doi: 10.1111/j.1399-302X.2005.00245.x.

Genco RJ, Van Dyke TE. Prevention: Reducing the risk of CVD in patients with periodontitis. *Nat Rev Cardiol*. 2010 Sep;7(9):479-80. doi: 10.1038/nrcardio.2010.120.

Gowrikumar S, Ahmad R, Uppada SB, Washington MK, Shi C, Singh AB, et al. Upregulated claudin-1 expression promotes colitis-associated cancer by promoting β -catenin phosphorylation and activation in Notch/p-AKT-dependent manner. *Oncogene*. 2019 Jun;38(26):5321-37. doi: 10.1038/s41388-019-0795-5

Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2008 Aug;79(8 Suppl):1585-91. doi: 10.1902/jop.2008.080183.

Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2015 Jan;15(1):30-44. doi: 10.1038/nri3785.

Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol*. 2012 Dec;27(6):409-19. doi: 10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x.

Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskan MA, et al. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe*. 2011 Nov 17;10(5):497-506. doi: 10.1016/j.chom.2011.10.006.

Hasturk H, Jones VL, Andry C, Kantarci A. 1-Tetradecanol complex reduces progression of *Porphyromonas gingivalis*-induced experimental periodontitis in rabbits. *J Periodontol*. 2007 May;78(5):924-32. doi: 10.1902/jop.2007.060293.

Haubek D. The highly leukotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: evolutionary aspects, epidemiology and etiological role in aggressive periodontitis. *APMIS Suppl*. 2010 Sep;(130):1-53. doi: 10.1111/j.1600-0463.2010.02665.x.

Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Vaeth M, Poulsen S, Kilian M. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet*. 2008 Jan 19;371(9608):237-42. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60135-X.

Haubek D, Johansson A. Pathogenicity of the highly leukotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its geographic dissemination and role in aggressive periodontitis. *J Oral Microbiol*. 2014 Aug 14;6. doi: 10.3402/jom.v6.23980.

Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 2003 Oct 1;102(7):2660-9. doi: 10.1182/blood-2003-04-1078.

Herbert BA, Novince CM, Kirkwood KL. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a potent immunoregulator of the periodontal host defense system and alveolar bone homeostasis. *Mol Oral Microbiol*. 2016 Jun;31(3):207-27. doi: 10.1111/omi.12119.

Herrero ER, Slomka V, Bernaerts K, Boon N, Hernandez-Sanabria E, Passoni BB, et al. Antimicrobial effects of commensal oral species are regulated by environmental factors. *J Dent*. 2016 Apr;47:23-33. doi: 10.1016/j.jdent.2016.02.007.

Hodin CM, Verdam FJ, Grootjans J, Rensen SS, Verheyen FK, Dejong CH, et al. Reduced Paneth cell antimicrobial protein levels correlate with activation of the unfolded protein response in the gut of obese individuals. *J Pathol*. 2011 Oct;225(2):276-84. doi: 10.1002/path.2917.

Honda K, Takaoka A, Taniguchi T. Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity*. 2006 Sep;25(3):349-60. doi: 10.1016/j.immuni.2006.08.009. Erratum in: *Immunity*. 2006 Nov;25(5):849.

Huang Y, Kittichotirat W, Mayer MP, Hall R, Bumgarner R, Chen C. Comparative genomic hybridization and transcriptome analysis with a pan-genome microarray reveal distinctions between JP2 and non-JP2 genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Mol Oral Microbiol*. 2013 Feb;28(1):1-17. doi: 10.1111/omi.12005.

Izawa A, Ishihara Y, Mizutani H, Kobayashi S, Goto H, Okabe E, et al. Inflammatory bone loss in experimental periodontitis induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in interleukin-1 receptor antagonist knockout mice. *Infect Immun*. 2014 May;82(5):1904-13. doi: 10.1128/IAI.01618-13.

Kailoo S, Shreya, Kumar Y. Cytolethal distending toxin: from genotoxin to a potential biomarker and anti-tumor target. *World J Microbiol Biotechnol*. 2021 Aug 11;37(9):150. doi: 10.1007/s11274-021-03117-z.

Kajita K, Honda T, Amanuma R, Domon H, Okui T, Ito H, et al. Quantitative messenger RNA expression of Toll-like receptors and interferon-alpha1 in gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Dec;22(6):398-402. doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00377.x.

Kajiya M, Komatsuzawa H, Papantonakis A, Seki M, Makihira S, Ouhara K, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Omp29 is associated with bacterial entry to gingival epithelial cells by F-actin rearrangement. *PLoS One*. 2011 Apr 29;6(4):e18287. doi: 10.1371/journal.pone.0018287.

Kaplan JB, Perry MB, MacLean LL, Furgang D, Wilson ME, Fine DH. Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infect Immun*. 2001 Sep;69(9):5375-84. doi: 10.1128/IAI.69.9.5375-5384.2001.

Kaye EK, Chen N, Cabral HJ, Vokonas P, Garcia RI. Metabolic Syndrome and Periodontal Disease Progression in Men. *J Dent Res*. 2016 Jul;95(7):822-8. doi: 10.1177/0022034516641053.

Kawamoto D, Borges R, Ribeiro RA, de Souza RF, Amado PPP, Saraiva L, et al. Oral Dysbiosis in Severe Forms of Periodontitis Is Associated With Gut Dysbiosis and Correlated With Salivary Inflammatory Mediators: A Preliminary Study. *Front Oral Health*. 2021 Oct 11;2:722495. doi: 10.3389/froh.2021.722495.

Keller A, Rohde JF, Raymond K, Heitmann BL. Association between periodontal disease and overweight and obesity: a systematic review. *J Periodontol*. 2015 Jun;86(6):766-76. doi: 10.1902/jop.2015.140589.

Kikkert R, Laine ML, Aarden LA, van Winkelhoff AJ. Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 2007 Jun;22(3):145-51. doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00335.x.

Kholy KE, Genco RJ, Van Dyke TE. Oral infections and cardiovascular disease. *Trends Endocrinol Metab.* 2015 Jun;26(6):315-21. doi: 10.1016/j.tem.2015.03.001.

Kinugasa T, Akagi Y, Yoshida T, Ryu Y, Shiratuchi I, Ishibashi N, et al. Increased claudin-1 protein expression contributes to tumorigenesis in ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2010 Aug;30(8):3181-6.

Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol.* 1991 Jan;62(1):59-73. doi: 10.1902/jop.1991.62.1.59.

Ko EB, Kim SK, Seo HS, Yun CH, Han SH. Serine-Rich Repeat Adhesins Contribute to *Streptococcus gordonii*-Induced Maturation of Human Dendritic Cells. *Front Microbiol.* 2017 Mar 31;8:523. doi: 10.3389/fmicb.2017.00523.

Koliarakis I, Messaritakis I, Nikolouzakis TK, Hamilos G, Souglakos J, Tsiaoussis J. Oral Bacteria and Intestinal Dysbiosis in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019 Aug 25;20(17):4146. doi: 10.3390/ijms20174146.

Komazaki R, Katagiri S, Takahashi H, Maekawa S, Shiba T, Takeuchi Y, et al. Periodontal pathogenic bacteria, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* affect non-alcoholic fatty liver disease by altering gut microbiota and glucose metabolism. *Sci Rep.* 2017 Oct 24;7(1):13950. doi: 10.1038/s41598-017-14260-9. Erratum in: *Sci Rep.* 2018 Mar 12;8(1):4620.

Konig MF, Abusleme L, Reinholdt J, Palmer RJ, Teles RP, Sampson K, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med.* 2016 Dec 14;8(369):369ra176. doi: 10.1126/scitranslmed.aaj1921.

Kowalczyk AP, Nanes BA. Adherens junction turnover: regulating adhesion through cadherin endocytosis, degradation, and recycling. *Subcell Biochem.* 2012;60:197-222. doi: 10.1007/978-94-007-4186-7_9.

Lafaurie GI, Contreras A, Barón A, Botero J, Mayorga-Fayad I, Jaramillo A, et al. Demographic, clinical, and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study. *J Periodontol*. 2007 Apr;78(4):629-39. doi: 10.1902/jop.2007.060187.

Lakio L, Lehto M, Tuomainen AM, Jauhiainen M, Malle E, Asikainen S, et al. Pro-atherogenic properties of lipopolysaccharide from the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Endotoxin Res*. 2006;12(1):57-64. doi: 10.1179/096805106X89099.

Lally ET, Golub EE, Kieba IR. Identification and immunological characterization of the domain of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin that determines its specificity for human target cells. *J Biol Chem*. 1994 Dec 9;269(49):31289-95.

Lamont RJ, Hajishengallis G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends Mol Med*. 2015 Mar;21(3):172-83. doi: 10.1016/j.molmed.2014.11.004.

Lauritano D, Sbordone L, Nardone M, Iapichino A, Scapoli L, Carinci F. Focus on periodontal disease and colorectal carcinoma. *Oral Implantol (Rome)*. 2017 Nov 30;10(3):229-33. doi: 10.11138/orl/2017.10.3.229.

Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006 Dec 21;444(7122):1022-3. doi: 10.1038/4441022a. PMID: 17183309.

Li X, Zhang B, Wang H, Zhao X, Zhang Z, Ding G, Wei F. The effect of aging on the biological and immunological characteristics of periodontal ligament stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2020 Jul 29;11(1):326. doi: 10.1186/s13287-020-01846-w.

Liccardo D, Marzano F, Carraturo F, Guida M, Femminella GD, Bencivenga L, et al. Potential Bidirectional Relationship Between Periodontitis and Alzheimer's Disease. *Front Physiol*. 2020 Jul 3;11:683. doi: 10.3389/fphys.2020.00683.

Lin X, Liu F, Li H, Yan Y, Bi L, Bu W, et al. Polyoxometalate-modulated self-assembly of polystyrene-block-poly(4-vinylpyridine). *Chem Commun (Camb)*. 2011 Sep 28;47(36):10019-21. doi: 10.1039/c1cc13123k.

Lindemann RA. Bacterial activation of human natural killer cells: role of cell surface lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 1988 May;56(5):1301-8. doi: 10.1128/iai.56.5.1301-1308.1988.

Lindemann RA. Roles of interferon and cellular adhesion molecules in bacterial activation of human natural killer cells. *Infect Immun*. 1989 Jun;57(6):1702-6. doi: 10.1128/iai.57.6.1702-1706.1989.

Liu X, Ramsey MM, Chen X, Koley D, Whiteley M, Bard AJ. Real-time mapping of a hydrogen peroxide concentration profile across a polymicrobial bacterial biofilm using scanning electrochemical microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Feb 15;108(7):2668-73. doi: 10.1073/pnas.1018391108.

Loos BG. Systemic effects of periodontitis. *Ann R Australas Coll Dent Surg*. 2006 Sep;18:27-9.

Lourenço TGB, Spencer SJ, Alm EJ, Colombo APV. Defining the gut microbiota in individuals with periodontal diseases: an exploratory study. *J Oral Microbiol*. 2018 Jul 3;10(1):1487741. doi: 10.1080/20002297.2018.1487741.

Lovibond AC, Haque SJ, Chambers TJ, Fox SW. TGF-beta-induced SOCS3 expression augments TNF-alpha-induced osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Oct 3;309(4):762-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.08.068.

Marshall RI. Gingival defensins: linking the innate and adaptive immune responses to dental plaque. *Periodontol* 2000. 2004;35:14-20. doi: 10.1111/j.0906-6713.2004.003568.x.

Martínez-Oca P, Robles-Vera I, Sánchez-Roncero A, Escrivá F, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J, et al. Gut DYSBIOSIS and altered barrier function precedes the appearance of metabolic syndrome in a rat model of nutrient-induced catch-up growth. *J Nutr Biochem*. 2020 Jul;81:108383. doi: 10.1016/j.jnutbio.2020.108383.

Mayer MP, Bueno LC, Hansen EJ, DiRienzo JM. Identification of a cytolethal distending toxin gene locus and features of a virulence-associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*. 1999 Mar;67(3):1227-37. doi: 10.1128/IAI.67.3.1227-1237.1999.

Meng W, Takeichi M. Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Dec;1(6):a002899. doi: 10.1101/cshperspect.a002899.

Meredith LW, Wilson GK, Fletcher NF, McKeating JA. Hepatitis C virus entry: beyond receptors. *Rev Med Virol*. 2012 May;22(3):182-93. doi: 10.1002/rmv.723.

Miyaguchi K. Ultrastructure of the zonula adherens revealed by rapid-freeze deep-etching. *J Struct Biol*. 2000 Dec;132(3):169-78. doi: 10.1006/jsbi.2000.4244.

Mohamed SG, Sugiyama E, Shinoda K, Taki H, Hounoki H, Abdel-Aziz HO, et al. Interleukin-10 inhibits RANKL-mediated expression of NFATc1 in part via suppression of c-Fos and c-Jun in RAW264.7 cells and mouse bone marrow cells. *Bone*. 2007 Oct;41(4):592-602. doi: 10.1016/j.bone.2007.05.016.

de Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, Chaves de Souza JA, Avila-Campos MJ, de Andrade CR, Cirelli JA. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *J Periodontol*. 2014 Mar;85(3):465-77. doi: 10.1902/jop.2013.130225.

Monasterio G, Fernández B, Castillo F, Rojas C, Cafferata EA, Rojas L, et al. Capsular-defective *Porphyromonas gingivalis* mutant strains induce less alveolar bone resorption than W50 wild-type strain due to a decreased Th1/Th17 immune response and less osteoclast activity. *J Periodontol*. 2019 May;90(5):522-34. doi: 10.1002/JPER.18-0079.

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 Microbiol Immunol*. 2003 Feb;18(1):54-8. doi: 10.1034/j.1399-302x.2003.180109.x.

Morishita M, Ariyoshi W, Okinaga T, Usui M, Nakashima K, Nishihara T. *A. actinomycetemcomitans* LPS enhances foam cell formation induced by LDL. *J Dent Res*. 2013 Mar;92(3):241-6. doi: 10.1177/0022034512473309.

Nakajima M, Arimatsu K, Kato T, Matsuda Y, Minagawa T, Takahashi N, et al. Oral Administration of *P. gingivalis* Induces Dysbiosis of Gut Microbiota and Impaired Barrier Function Leading to Dissemination of Enterobacteria to the Liver. *PLoS One*. 2015a Jul 28;10(7):e0134234. doi: 10.1371/journal.pone.0134234.

Nakajima M, Nagase S, Iida M, Takeda S, Yamashita M, Watari A, et al. Claudin-1 Binder Enhances Epidermal Permeability in a Human Keratinocyte Model. *J Pharmacol Exp Ther*. 2015b Sep;354(3):440-7. doi: 10.1124/jpet.115.225391.

Neal MD, Leaphart C, Levy R, Prince J, Billiar TR, Watkins S, et al. Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier. *J Immunol.* 2006 Mar 1;176(5):3070-9. doi: 10.4049/jimmunol.176.5.3070.

Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. Streptococcus adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009 Sep;73(3):407-50, Table of Contents. doi: 10.1128/MMBR.00014-09.

Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006 Sep;56(Pt 9):2135-46. doi: 10.1099/ijs.0.64207-0.

Nusrat A, Turner JR, Madara JL. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000 Nov;279(5):G851-7. doi: 10.1152/ajpgi.2000.279.5.G851.

Olsen PH, Ambros V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol.* 1999 Dec 15;216(2):671-80. doi: 10.1006/dbio.1999.9523.

Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2018 Jun;89 Suppl 1:S173-S182. doi: 10.1002/JPER.17-0721.

Park OJ, Kim J, Kim HY, Kwon Y, Yun CH, Han SH. *Streptococcus gordonii* induces bone resorption by increasing osteoclast differentiation and reducing osteoblast differentiation. *Microb Pathog.* 2019 Jan;126:218-23. doi: 10.1016/j.micpath.2018.11.005.

Park OJ, Kwon Y, Park C, So YJ, Park TH, Jeong S, Im J, Yun CH, Han SH. *Streptococcus gordonii*: Pathogenesis and Host Response to Its Cell Wall Components. *Microorganisms.* 2020 Nov 24;8(12):1852. doi: 10.3390/microorganisms8121852.

Pasini E, Corsetti G, Assanelli D, Testa C, Romano C, Dioguardi FS, et al. Effects of chronic exercise on gut microbiota and intestinal barrier in human with type 2 diabetes. *Minerva Med.* 2019 Feb;110(1):3-11. doi: 10.23736/S0026-4806.18.05589-1.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9):e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.

Pope JL, Ahmad R, Bhat AA, Washington MK, Singh AB, Dhawan P. Claudin-1 overexpression in intestinal epithelial cells enhances susceptibility to adenomatous polyposis coli-mediated colon tumorigenesis. *Mol Cancer.* 2014 Jul 6;13:167. doi: 10.1186/1476-4598-13-167.

Pussinen PJ, Alfthan G, Rissanen H, Reunanen A, Asikainen S, Knekt P. Antibodies to periodontal pathogens and stroke risk. *Stroke.* 2004 Sep;35(9):2020-3. doi: 10.1161/01.STR.0000136148.29490.fe.

Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:635-700. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.

Ramsey MM, Rumbaugh KP, Whiteley M. Metabolite cross-feeding enhances virulence in a model polymicrobial infection. *PLoS Pathog.* 2011 Mar;7(3):e1002012. doi: 10.1371/journal.ppat.1002012.

Rebeis ES, Albuquerque-Souza E, Paulino da Silva M, Giudicissi M, Mayer MPA, Saraiva L. Effect of periodontal treatment on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* colonization and serum IgG levels against *A. actinomycetemcomitans* serotypes and Omp29 of aggressive periodontitis patients. *Oral Dis.* 2019 Mar;25(2):569-79. doi: 10.1111/odi.13010.

Repeke CE, Ferreira SB Jr, Claudino M, Silveira EM, de Assis GF, Avila-Campos MJ, et al. Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and its receptors CCR1+ and CCR5+ in RANKL+ cell migration throughout experimental periodontitis in mice. *Bone.* 2010 Apr;46(4):1122-30. doi: 10.1016/j.bone.2009.12.030.

Reyes L, Herrera D, Kozarov E, Roldán S, Progulske-Fox A. Periodontal bacterial invasion and infection: contribution to atherosclerotic pathology. *J Clin Periodontol.* 2013 Apr;40 Suppl 14:S30-50. doi: 10.1111/jcpe.12079.

Rogers JE, Li F, Coatney DD, Rossa C, Bronson P, Krieder JM, et al. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. J Periodontol. 2007 Mar;78(3):550-8. doi: 10.1902/jop.2007.060321.

Rojas L, Melgar-Rodríguez S, Díaz-Zúñiga J, Alvarez C, Monasterio G, Rojas C, et al. Serotype a of Aggregatibacter actinomycetemcomitans down-regulates the increased serotype b-induced cytokine and chemokine production in dendritic cells. Arch Oral Biol. 2018 Sep;93:155-62. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.06.010.

Rosen G, Nisimov I, Helcer M, Sela MN. Actinobacillus actinomycetemcomitans serotype b lipopolysaccharide mediates coaggregation with Fusobacterium nucleatum. Infect Immun. 2003 Jun;71(6):3652-6. doi: 10.1128/IAI.71.6.3652-3656.2003.

Rudney JD, Chen R, Pan Y. Endpoint quantitative PCR assays for Bacteroides forsythus, Porphyromonas gingivalis, and Actinobacillus actinomycetemcomitans. J Periodontol. 2003 Oct;38(5):465-70. doi: 10.1034/j.1600-0765.2003.00670.x.

Sartori R, Li F, Kirkwood KL. MAP kinase phosphatase-1 protects against inflammatory bone loss. J Dent Res. 2009 Dec;88(12):1125-30. doi: 10.1177/0022034509349306.

Sasaki H, Hou L, Belani A, Wang CY, Uchiyama T, Müller R, Stashenko P. IL-10, but not IL-4, suppresses infection-stimulated bone resorption in vivo. J Immunol. 2000 Oct 1;165(7):3626-30. doi: 10.4049/jimmunol.165.7.3626.

Sbordone L, Bortolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. Clin Oral Investig. 2003 Dec;7(4):181-8. doi: 10.1007/s00784-003-0236-1.

Scannapieco FA, Bush RB, Paju S. Associations between periodontal disease and risk for atherosclerosis, cardiovascular disease, and stroke. A systematic review. Ann Periodontol. 2003 Dec;8(1):38-53. doi: 10.1902/annals.2003.8.1.38.

Schenkein HA, Barbour SE, Tew JG. Cytokines and inflammatory factors regulating immunoglobulin production in aggressive periodontitis. Periodontol 2000. 2007;45:113-27. doi: 10.1111/j.1600-0757.2007.00214.x.

Shaddox LM, Wiedey J, Calderon NL, Magnusson I, Bimstein E, Bidwell JA, et al. Local inflammatory markers and systemic endotoxin in aggressive periodontitis. *J Dent Res*. 2011 Sep;90(9):1140-4. doi: 10.1177/0022034511413928.

Shen L. Tight junctions on the move: molecular mechanisms for epithelial barrier regulation. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Jul;1258:9-18. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06613.x.

Shen Y, Zhou M, Yan J, Gong Z, Xiao Y, Zhang C, et al. miR-200b inhibits TNF- α -induced IL-8 secretion and tight junction disruption of intestinal epithelial cells in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2017 Feb 1;312(2):G123-G132. doi: 10.1152/ajpgi.00316.2016.

Shenker BJ, Boesze-Battaglia K, Zekavat A, Walker L, Besack D, Ali H. Inhibition of mast cell degranulation by a chimeric toxin containing a novel phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate phosphatase. *Mol Immunol*. 2010 Nov-Dec;48(1-3):203-10. doi: 10.1016/j.molimm.2010.08.009.

Shenker BJ, Walker LP, Zekavat A, Dlakić M, Boesze-Battaglia K. Blockade of the PI-3K signalling pathway by the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin induces macrophages to synthesize and secrete pro-inflammatory cytokines. *Cell Microbiol*. 2014 Sep;16(9):1391-404. doi: 10.1111/cmi.12299.

Shultis WA, Weil EJ, Looker HC, Curtis JM, Shlossman M, Genco RJ, et al. Effect of periodontitis on overt nephropathy and end-stage renal disease in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2007 Feb;30(2):306-11. doi: 10.2337/dc06-1184.

Slots J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol*. 1982 Apr;15(4):606-9. doi: 10.1128/jcm.15.4.606-609.1982.

Stacy A, Everett J, Jorth P, Trivedi U, Rumbaugh KP, Whiteley M. Bacterial fight-and-flight responses enhance virulence in a polymicrobial infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 May 27;111(21):7819-24. doi: 10.1073/pnas.1400586111.

Stacy A, Fleming D, Lamont RJ, Rumbaugh KP, Whiteley M. A Commensal Bacterium Promotes Virulence of an Opportunistic Pathogen via Cross-Respiration. *mBio*. 2016 Jun 28;7(3):e00782-16. doi: 10.1128/mBio.00782-16.

Stuehr DJ, Griffith OW. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1992;65:287-346. doi: 10.1002/9780470123119.ch8.

Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci.* 2013 Feb;70(4):631-59. doi: 10.1007/s00018-012-1070-x.

Takamatsu D, Bensing BA, Cheng H, Jarvis GA, Siboo IR, López JA, et al. Binding of the *Streptococcus gordonii* surface glycoproteins GspB and Hsa to specific carbohydrate structures on platelet membrane glycoprotein Ibalpha. *Mol Microbiol.* 2005 Oct;58(2):380-92. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04830.x.

Takeuchi H, Iba M, Inoue H, Higuchi M, Takao K, Tsukita K, et al. P301S mutant human tau transgenic mice manifest early symptoms of human tauopathies with dementia and altered sensorimotor gating. *PLoS One.* 2011;6(6):e21050. doi: 10.1371/journal.pone.0021050.

Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis as a prerequisite for IBD. *Gut.* 2004 Jul;53(7):1057.

Tang YL, Sim TS, Tan KS. Oral streptococci subvert the host innate immune response through hydrogen peroxide. *Sci Rep.* 2022 Jan 13;12(1):656. doi: 10.1038/s41598-021-04562-4.

Teixeira RE, Mendes EN, Roque de Carvalho MA, Nicoli JR, Farias Lde M, Magalhães PP. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype-specific genotypes and periodontal status in Brazilian subjects. *Can J Microbiol.* 2006 Mar;52(3):182-8. doi: 10.1139/w05-121.

Teixeira SR, Mattarazo F, Feres M, Figueiredo LC, de Faveri M, Simionato MR, et al. Quantification of *Porphyromonas gingivalis* and fimA genotypes in smoker chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2009 Jun;36(6):482-7. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01411.x.

Teng CT. Regulation of lactoferrin gene expression by estrogen and epidermal growth factor: molecular mechanism. *Cell Biochem Biophys.* 1999;31(1):49-64. doi: 10.1007/BF02738154.

Teng MP, Catherwood LE, Melby DP. Cost effectiveness of therapies for atrial fibrillation. A review. *Pharmacoeconomics*. 2000 Oct;18(4):317-33. doi: 10.2165/00019053-200018040-00002.

Tomás JM. The main *Aeromonas* pathogenic factors. *ISRN Microbiol*. 2012 Sep 4;2012:256261. doi: 10.5402/2012/256261.

Tonetti MS. Periodontitis and risk for atherosclerosis: an update on intervention trials. *J Clin Periodontol*. 2009 Jul;36 Suppl 10:15-9. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01417.x.

Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4(1):39-53. doi: 10.1902/annals.1999.4.1.39.

Tonetti MS, Van Dyke TE; working group 1 of the joint EFP/AAP workshop*. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol*. 2013 Apr;84 Suppl 4S:S24-S29. doi: 10.1902/jop.2013.1340019.

Trombone AP, Ferreira SB Jr, Raimundo FM, de Moura KC, Avila-Campos MJ, Silva JS, et al. Experimental periodontitis in mice selected for maximal or minimal inflammatory reactions: increased inflammatory immune responsiveness drives increased alveolar bone loss without enhancing the control of periodontal infection. *J Periodontol Res*. 2009 Aug;44(4):443-51.

Tsai CC, Ho YP, Chou YS, Ho KY, Wu YM, Lin YC. *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* leukotoxin and human periodontitis - A historic review with emphasis on JP2. *Kaohsiung J Med Sci*. 2018 Apr;34(4):186-93. doi: 10.1016/j.kjms.2018.01.014. Epub 2018 Feb 17. PMID: 29655406.

Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Apr;2(4):285-93. doi: 10.1038/35067088.

Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007 Aug;56(8):1986-98. doi: 10.2337/db06-1595.

Tuin A, Huizinga-Van der Vlag A, van Loenen-Weemaes AM, Meijer DK, Poelstra K. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 Feb;290(2):G377-85. doi: 10.1152/ajpgi.00147.2005.

Van Vlasselaer P, Borremans B, van Gorp U, Dasch JR, De Waal-Malefyt R. Interleukin 10 inhibits transforming growth factor-beta (TGF-beta) synthesis required for osteogenic commitment of mouse bone marrow cells. *J Cell Biol*. 1994 Feb;124(4):569-77. doi: 10.1083/jcb.124.4.569.

Vernier A, Diab M, Soell M, Haan-Archipoff G, Beretz A, Wachsmann D, et al. Cytokine production by human epithelial and endothelial cells following exposure to oral viridans streptococci involves lectin interactions between bacteria and cell surface receptors. *Infect Immun*. 1996 Aug;64(8):3016-22. doi: 10.1128/iai.64.8.3016-3022.1996.

Wang J, Ji H, Wang S, Liu H, Zhang W, Zhang D, et al. Probiotic *Lactobacillus plantarum* Promotes Intestinal Barrier Function by Strengthening the Epithelium and Modulating Gut Microbiota. *Front Microbiol*. 2018 Aug 24;9:1953. doi: 10.3389/fmicb.2018.01953.

Weber CR, Nalle SC, Tretiakova M, Rubin DT, Turner JR. Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Lab Invest*. 2008 Oct;88(10):1110-20. doi: 10.1038/labinvest.2008.78.

Wilensky A, Gabet Y, Yumoto H, Houry-Haddad Y, Shapira L. Three-dimensional quantification of alveolar bone loss in Porphyromonas gingivalis-infected mice using micro-computed tomography. *J Periodontol*. 2005 Aug;76(8):1282-6. doi: 10.1902/jop.2005.76.8.1282.

Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, et al. STAT3 Regulates Cytokine-mediated Generation of Inflammatory Helper T Cells. *J Biol Chem* 2007 Mar 30;282(13):9358–63. doi: 10.1074/jbc.C600321200.

Yue G, Kaplan JB, Furgang D, Mansfield KG, Fine DH. A second *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* autotransporter adhesin exhibits specificity for buccal epithelial cells in humans and Old World primates. *Infect Immun*. 2007 Sep;75(9):4440-8. doi: 10.1128/IAI.02020-06.

Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR 3rd, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathog.* 2012;8(4):e1002623. doi: 10.1371/journal.ppat.1002623.

Xu LX, Kukita T, Kukita A, Otsuka T, Niho Y, Iijima T. Interleukin-10 selectively inhibits osteoclastogenesis by inhibiting differentiation of osteoclast progenitors into preosteoclast-like cells in rat bone marrow culture system. *J Cell Physiol.* 1995 Dec;165(3):624-9. doi: 10.1002/jcp.1041650321.

Zambon JJ, Sunday GJ, Smutko JS. Molecular genetic analysis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* epidemiology. *J Periodontol.* 1990 Feb;61(2):75-80. doi: 10.1902/jop.1990.61.2.75.

Zhang Q, Chen B, Yan F, Guo J, Zhu X, Ma S, et al. Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. *Biomed Res Int.* 2014;2014:284836. doi: 10.1155/2014/284836.

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. *Infect Immun.* 2006 Aug;74(8):4927-31. doi: 10.1128/IAI.00491-06.

Zhen Y, Zhang H. NLRP3 Inflammasome and Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol.* 2019 Feb 28;10:276. doi: 10.3389/fimmu.2019.00276.

ANEXO A – Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas



Universidade de São Paulo
**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da associação de *A. actinomycetemcomitans* e *S. gordonii* na periodontite experimental em modelo murino e suas repercussões sobre o tecido gengival e a mucosa intestinal e perfil inflamatório.", protocolada sob o CEUA nº 4828281020, sob a responsabilidade de **Marcia Pinto Alves Mayer e equipe; Catarina Medeiros Rocha; Catarina Medeiros Rocha; Manuela Rocha Bueno; Natali Shimabukuro; Manuela Rocha Bueno; Natali Shimabukuro** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprova**da pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 13/05/2021.

We certify that the proposal "Effect of association between *A. actinomycetemcomitans* and *S. gordonii* on experimental periodontitis murine model and its repercussions on the gingival tissue and intestinal mucosa and inflammatory profile.", utilizing 48 isogenics mice (48 males), protocol number CEUA 4828281020, under the responsibility of **Marcia Pinto Alves Mayer and team; Catarina Medeiros Rocha; Catarina Medeiros Rocha; Manuela Rocha Bueno; Natali Shimabukuro; Manuela Rocha Bueno; Natali Shimabukuro** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 05/13/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **12 meses**

Depto/Setor: **Microbiologia**

Origem: **Biotério Central FMUSP**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

Idade ou peso: **6 a 8 semanas**

Linhagem: **C57B/6**

N amostral: 48

São Paulo, 20 de maio de 2021

Prof. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Dr. Alexandre Ceroni
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)