

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

SAMUEL DE BARROS FERREIRA JUNIOR

**Modulação da severidade da doença periodontal  
experimental por células CCR5+**

BAURU

2009



SAMUEL DE BARROS FERREIRA JUNIOR

**Modulação da severidade da doença periodontal  
experimental por células CCR5+**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia  
de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Biologia Oral  
Orientador: Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

BAURU

2009

Ferreira Junior, Samuel de Barros  
F413m Modulação da severidade da doença periodontal  
experimental por células CCR5+ / Samuel de Barros  
Ferreira Junior. -- Bauru, 2009.  
115 p. : il. ; 31 cm.

Dissertação. (Mestrado) -- Faculdade de Odontologia de  
Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Autorizo, exclusivamente pra fins acadêmicos e científicos, a  
reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos  
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data:

Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB-USP:

Protocolo nº: 016/2007

Data: 13/03/2008





***DEDICATÓRIA***

***Dedico este trabalho...***

À Minha esposa Ludmila  
Companheira de todas as horas.

Aos meus pais Eliane e Samuel  
Por tudo o que fizeram por mim.

Aos meus irmãos Marcello Vinícius e Rafael  
Pela amizade incondicional.

---





## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço a Deus. Por me permitir chegar até aqui.

Aos meus pais, Eliane e Samuel, meus exemplos de vida. Que tudo por mim fizeram nunca medindo esforços. Pelas suas atitudes e exemplos que valeram muito mais do que qualquer palavra.

Aos meus irmãos, Marcello Vinícius e Rafael, pelas brincadeiras, pelas brigas, pelos momentos alegres e momentos difíceis que passamos juntos. Por todos os momentos preciosos que vivemos e nos fizeram crescer.

À minha amada esposa Ludmila, que em todos os momentos esteve ao meu lado, sempre apoiando, consolando e me ajudando a seguir em frente. Obrigado pelo seu amor e paciência!

Aos meus avós, tios, tias, primos e primas. Obrigado por tudo o que vocês representam para mim. Pelo apoio e incentivo constantes.

Aos meus sogros, Silvana e Wilson. Que também me acompanharam nesta jornada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet. Pela confiança em mim depositada. Pelos ensinamentos pacientemente transmitidos. Pela amizade.

Agradeço também aos demais professores do Departamento de Histologia, Prof. Dr. Rumio Taga e Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis.

Aos meus colegas e amigos do laboratório Carlos Eduardo Repeke e Marcela Claudino, que compartilharam comigo esses anos de estudo. Por toda contribuição científica durante as discussões e experimentos e também pelos momentos divertidos, pelo papo furado... Pela amizade que cultivamos.

Ao Erivan S. Ramos Jr. e Carlos Eduardo Repeke, pelos treinos de corrida mais divertidos que poderiam existir.

Aos colegas e amigos da pós graduação. Pelos momentos divertidos que passamos juntos nas mesas da cantina depois do almoço no bandeirão, nos churrascos e no basquete das quartas-feiras.

Aos colegas e amigos da época da especialização, Ana Lúcia Almeida, Luis Augusto Esper, Michyele Sbrana, Ingrid Ribeiro e Erick Siqueira. Por juntos descobrirmos a paixão pela ciência e pela presença e estímulo constantes.

---



À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Estomatologia e Biologia Oral.

Aos funcionários e estagiários do Departamento de Histologia. Em especial, à Tania Mary Cestari, à Danielle Santi Ceolin por estarem sempre dispostas a ajudar.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

E a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

Samuel B. Ferreira Jr

---



**A**inda que eu fale as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, serei como o bronze que soa ou como o címbalo que retine.

Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei.

E ainda que eu distribua todos os meus bens entre os pobres e ainda que entregue o meu próprio corpo para ser queimado, se não tiver amor, nada disso me aproveitará.

O amor é paciente, é benigno; o amor não arde em ciúmes, não se ufana, não se ensoberbece, não se conduz inconvenientemente, não procura os seus interesses, não se exaspera, não se ressentido do mal; não se alegra com a injustiça, mas regozija-se com a verdade; tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.

O amor jamais acaba; mas, havendo profecias, desaparecerão; havendo línguas, cessarão; havendo ciência, passará; porque, em parte, conhecemos e, em parte, profetizamos. Quando, porém, vier o que é perfeito, então, o que é em parte será aniquilado.

Quando eu era menino, falava como menino, sentia como menino, pensava como menino; quando cheguei a ser homem, desisti das coisas próprias de menino.

Porque, agora, vemos como em espelho, obscuramente; então, veremos face a face. Agora, conheço em parte; então, conhecerei como também sou conhecido.

Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três; porém o maior destes é o amor.

*Paulo de Tarso*

*I Coríntios 13 – Bíblia Sagrada*

---



## SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>  | 25  |
| <b>2 PROPOSIÇÃO</b>  | 39  |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>  | 43  |
| 3.1 Animais de experimentação  | 43  |
| 3.2 Protocolo de indução de doença periodontal   | 43  |
| 3.3 Coleta de amostras   | 44  |
| 3.4 Avaliação da reabsorção óssea alveolar   | 45  |
| 3.5 Análise quantitativa e qualitativa do infiltrado inflamatório  | 45  |
| 3.6 Extração de RNA e Transcrição Reversa  | 47  |
| 3.7 Reações de RealTime-PCR  | 47  |
| 3.8 Dosagem de RANKL e OPG por ELISA   | 48  |
| 3.9 Dosagem de mieloperoxidase (MPO)   | 49  |
| 3.10 Detecção e quantificação de <i>A. actinomycetemcomitans</i>   | 49  |
| 3.11 Análise estatística   | 50  |
| <b>4 RESULTADOS</b>  | 53  |
| 4.1 Análise fenotípica das células CCR5+ extraídas dos tecidos periodontais de camundongos infectados com <i>A. actinomycetemcomitans</i>  | 53  |
| 4.2 Análise cinética da migração das células CCR5+ e RANKL+ para os tecidos periodontais de camundongos infectados com <i>A. actinomycetemcomitans</i>                                     | 55  |
| 4.3 Papel do CCR5 na modulação da reação inflamatória e perda óssea alveolar induzida por <i>A. actinomycetemcomitans</i>  | 57  |
| 4.4 Papel de CCR5 na modulação da expressão de citocinas e quimiocinas nos tecidos periodontais de camundongos infectados com <i>A. actinomycetemcomitans</i>                              | 61  |
| 4.5 Papel de CCR5 na modulação da expressão MMPs, RANKL e seus respectivos inibidores, TIMPs e OPG, nos tecidos periodontais de camundongos infectados com <i>A. actinomycetemcomitans</i> | 65  |
| 4.6 Papel do CCR5 na modulação da infecção experimental por <i>A. actinomycetemcomitans</i>  | 71  |
| <b>5 DISCUSSÃO</b>   | 77  |
| <b>6 CONCLUSÕES</b>  | 89  |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | 93  |
| <b>ANEXOS</b>  | 113 |

---





***R****esumo*



## **RESUMO**

As doenças periodontais (DP) afetam os tecidos de suporte dos dentes e são desencadeadas por micro-organismos gram-negativos anaeróbios presentes no biofilme periodontal. A evolução da doença é influenciada pela resposta inflamatória e imunológica do hospedeiro e envolve a participação de diversos tipos celulares, que atuam no micro ambiente local modulando a resposta do hospedeiro em busca do controle da infecção. Acredita-se que citocinas inflamatórias, quimiocinas e seus receptores estão envolvidos na migração celular para os tecidos periodontais, contudo, pouco se sabe sobre os mecanismos de determinação de resistência ou susceptibilidade às DP; ou no desencadeamento do dano tecidual decorrente da resposta. Neste projeto, avaliou-se o papel das células CCR5+ na DP experimental induzida pela inoculação oral de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em camundongos C57BL/6 *wild type* e camundongos CCR5-*knockout*. Os resultados mostram que a maioria das células CCR5+ possuem fenótipo compatível com células T do subtipo Th1, devido a co-expressão de CD3 e CXCR3; além de co-expressarem RANKL. Na ausência das células CCR5+, houve uma significativa diminuição da migração de células inflamatórias totais e RANKL+ para os tecidos periodontais, diminuição da reabsorção óssea alveolar, diminuição dos níveis de expressão de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ , assim como diminuição na expressão de MMP-1, MMP-2 e MMP-13. Sua ausência não interferiu no controle da infecção periodontal apesar da diminuição dos níveis de iNOS. Estes resultados conduzem à conclusão de que a maioria das células CCR5+ são células T do subtipo Th1, que atuam como importantes moduladoras das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ , das metaloproteinases de matriz MMP-1, MMP-2 e MMP-13, e que também expressam e modulam a expressão de RANKL, tendo participação importante na imunopatogenese da DP experimental, sem interferir no controle da infecção periodontal. Estes fatos tornam as células CCR5+ potenciais alvos para intervenção terapêutica visando ao controle das doenças periodontais.

**Palavras-chave:** Periodontite. Reabsorção óssea. Citocinas. Quimiocinas. Receptores CCR5. RANKL. Células Th1. *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*.

---



# ***A**bstract*



## **ABSTRACT**

### **Modulation of experimental periodontal disease severity by CCR5+ cells**

The periodontal diseases (PD) affect the supportive tissues of the teeth and are triggered by periodontopathogens present in the dental biofilm. The clinical outcome is highly influenced by the host inflammatory and immune response with participation of many cellular types, that act in the local microenvironment modulating the host response to control the infection. Inflammatory cytokines, chemokines and its receptors are thought to be involved in the cellular migration to the periodontal tissues, but there is little knowledge about the mechanisms of determination of resistance or susceptibility to the PD and in the triggering of tissue damage by immune response components. This study evaluated the role of CCR5+ cells in the experimental PD induced by oral inoculation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in C57BL/6 wild type mice and CCR5-knockout mice. The phenotypic analysis of inflammatory infiltrate demonstrated that the most of CCR5+ cells co-express CD3 and CXCR3, suggesting a phenotype compatible with Th1-type cells, and also co-express RANKL. In the absence of CCR5+ cells there was a significant overall reduction of inflammatory cells and RANKL+ cells influx to the periodontal tissues, reduction in the alveolar bone resorption, reduction in the levels of pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and INF- $\gamma$  expression, as a reduction in the expression of MMP-1, MMP-2 and MMP-13. The absence of CCR5+ cells did not impair the control of periodontal infection, despite the reduction of iNOS levels. In conclusion, these data demonstrate that the most of CCR5+ cells are Th1 cells, which act as important modulators of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and INF- $\gamma$ , MMP-1, MMP-2 and MMP-13 levels, and which also express and modulate the expression of RANKL, playing an important role in the immunopathogenesis of experimental PD, without impairing the control of periodontal infection. These facts point to CCR5+ cells as potentials targets to therapeutic interventions aimed to control periodontal diseases.

**Keywords: Periodontitis. Bone resorption. Cytokines. Chemokines. CCR5 Receptors. RANKL. Th1 cells. Aggregatibacter Actinomycetemcomitans.**

---





# ***I**ntrodução*



## **1 INTRODUÇÃO**

As doenças periodontais (DP) incluem diversas alterações dos tecidos de proteção e sustentação dos órgãos dentais, cuja etiologia está relacionada à placa dental bacteriana (LOESCHE, 1993). Mesmo em condições clínicas de saúde, os tecidos periodontais estão em confronto contínuo com micro-organismos potencialmente patogênicos, e até certo ponto, convivem eficazmente com estas agressões. Porém, em situações de acúmulo de placa dental, alterações qualitativas e quantitativas ocorrem no microambiente do biofilme bacteriano, gerando uma grande quantidade de produtos microbianos e intensa carga antigênica no sulco gengival, sendo o tecido conjuntivo povoado por células e mediadores inflamatórios, surgindo então os sinais clínicos de doença (KINANE e LAPPIN, 2001; YAMAZAKI, YOSHIE e SEYMOUR, 2003; KINANE e ATTSTROM, 2005). Em termos epidemiológicos, as diferentes modalidades de DP atingem quase a totalidade da população, sendo importante causa de perda dental entre adultos, e atualmente tem sido descritas como fatores modificadores da saúde sistêmica dos pacientes (1996; 1999; IDE et al., 2004; DIETRICH e GARCIA, 2005).

Apesar da presença de micro-organismos patogênicos ser necessária para o início do desenvolvimento da doença, tem-se mostrado que a amplificação e progressão deste processo são altamente dependentes da resposta imune e inflamatória gerada pelo hospedeiro em resposta às bactérias ou seus produtos (KINANE e LAPPIN, 2001; TENG, 2003; KINANE e ATTSTROM, 2005). Embora tal resposta supostamente proteja o hospedeiro da invasão microbiana em larga escala, a relativa inacessibilidade dos leucócitos e de fatores antimicrobianos aos micro-organismos no sulco gengival, somada à proteção conferida por sua organização na forma de biofilme, inviabilizam a eliminação dos agentes infecciosos (EBERSOLE e TAUBMAN, 1994; PAGE, 1998; EBERSOLE, CAPPELLI e HOLT, 2001; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2002; SBORDONE e BORTOLAIA, 2003). Além disso, acredita-se que a presença de diversos micro-organismos com grande capacidade de invasão tecidual nos tecidos periodontais propicie acesso a sua disseminação pelo organismo. De fato,

---

estudos recentes têm demonstrado que pacientes com DP apresentam uma marcante resposta sistêmica de fase aguda, a qual é controlada após o tratamento periodontal (SLADE et al., 2000; NOACK et al., 2001; MATTILA et al., 2002; D'AIUTO et al., 2004; AMABILE et al., 2008). Tal resposta supostamente estaria envolvida na alteração da saúde sistêmica apresentada pelos pacientes com DP, conforme alguns estudos que demonstram que a DP leva a predisposição, agravamento e até mesmo a ocorrência de diversas patologias, como aterosclerose, parto prematuro, infecções respiratórias, doenças cardiovasculares e até mesmo a morte (EBERSOLE e CAPPELLI, 2000; CRAIG et al., 2003; LALLA et al., 2003; IDE et al., 2004; LINDEN et al., 2008; SUN et al., 2008). Modelos experimentais de DP têm reforçado tal hipótese, demonstrando que a infecção por diferentes periodontopatógenos pode apresentar significantes efeitos sistêmicos (LALLA et al., 2003; GIBSON et al., 2004; HAN et al., 2004; STERN et al., 2004). Em conjunto, esses trabalhos nos levam a questionar o grau de proteção conferido ao hospedeiro pela resposta imune e inflamatória frente à infecção dos tecidos periodontais. Entretanto, os mecanismos envolvidos no controle da infecção periodontal, assim como seu grau de influência na saúde sistêmica do hospedeiro, ainda não são completamente conhecidos.

O fato concreto é que a permanência de um foco infeccioso em íntima associação aos tecidos periodontais leva à manutenção de uma reação inflamatória crônica local. Tal resposta leva a destruição tecidual através de mecanismos que incluem a produção de citocinas, quimiocinas, enzimas envolvidas na degradação de tecido conjuntivo e da expressão de fatores de diferenciação e ativação de osteoclastos (BAKER, 2000; GARLET et al., 2003; GRAVES e COCHRAN, 2003; TENG, 2003; SILVA et al., 2007; COCHRAN, 2008).

Dentre as proteases envolvidas na degradação e remodelação de proteínas da matriz extracelular, estão as metaloproteases de matriz (MMPs), as quais desempenham papel tanto em processos fisiológicos como patológicos. As MMPs são uma família de proteases cuja atividade é dependente de zinco e/ou cálcio, e são divididas em 4 subclasses com base na especificidade de seus substratos: collagenases, como a MMP-1 ou collagenase intersticial, ativa contra colágeno fibrilar; gelatinases, também chamadas de collagenases do tipo IV (A ou MMP-2, e B ou MMP-9), que apresentam alta atividade contra colágeno desnaturado; estromalisinas, que degradam componentes de natureza não colágena presentes na matriz extracelular; e metaloproteases de membrana (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993; WERB, 1997). A ativação das MMPs é regulada por um grupo de proteínas endógenas, chamado de inibidores teciduais de metaloproteases (TIMPs), capazes

---

---

de inibir praticamente todos os membros da família das MMPs, de forma não específica (BAKER, EDWARDS e MURPHY, 2002). Em condições fisiológicas, os TIMPs estão em balanço com as MMPs, sendo a matriz extracelular remodelada de forma extremamente controlada. Contudo, em diversos estados patológicos, verifica-se a elevação dos níveis de MMPs sem o concomitante aumento na expressão dos TIMPs, aumentando a atividade proteolítica e levando à destruição tecidual (DEAN et al., 1989; MURPHY, 1991; REYNOLDS, 1996; NAWROCKI et al., 1997; LI, MCTIERNAN e FELDMAN, 2000; PARSONS et al., 2004). Por outro lado, a elevação dos níveis de TIMPs, ou diminuição dos níveis de MMPs, também está associada a processos patológicos, como por exemplo, a quadros de fibrose (IREDALE, 1997).

MMPs como MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-8, MMP-13 e MT-1MMP têm sido identificadas em tecidos periodontais (KUBOTA et al., 1996; TERVAHARTIALA et al., 2000; KIILI et al., 2002; ACHONG et al., 2003; EJEIL et al., 2003; CESAR NETO et al., 2004; SMITH et al., 2004) e no fluido gengival (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-13) (ALPAGOT et al., 2001; KIILI et al., 2002; TUTER, KURTIS e SERDAR, 2002; GRAYSON et al., 2003; KINANE et al., 2003; REDDY, GEURS e GUNSOLLEY, 2003; EMINGIL et al., 2004), sendo encontradas em baixos níveis em tecidos normais, e altas concentrações são verificadas em tecidos inflamados (ALPAGOT et al., 2001; KINANE et al., 2003; SMITH et al., 2004). Diversos TIMPs também são encontrados em tecidos periodontais (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3) (KUBOTA et al., 1996; SEGUIER et al., 2001; REDDY, GEURS e GUNSOLLEY, 2003), no fluido gengival (TIMP-1, TIMP-2) (NOMURA et al., 1998; ALPAGOT et al., 2001; TUTER, KURTIS e SERDAR, 2002), assim como são produzidos por fibroblastos gengivais *in vitro* (TIMP-1, TIMP-2) (KUT-LASSERRE et al., 2001). Dessa forma, acredita-se que MMPs e TIMPs estejam envolvidos no *turnover* fisiológico dos tecidos periodontais, assim como na destruição tecidual vista nas DP (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; REYNOLDS, HEMBRY e MEIKLE, 1994; VAN DER ZEE, EVERTS e BEERTSEN, 1997; GOLUB et al., 2001; RAMAMURTHY et al., 2002; EJEIL et al., 2003; REDDY, GEURS e GUNSOLLEY, 2003; BJORNSSON et al., 2004; EMINGIL et al., 2004).

Além da destruição de tecido conjuntivo, a reabsorção óssea alveolar é um evento chave nas DP. A integridade do tecido ósseo depende da manutenção de um delicado equilíbrio entre a reabsorção óssea pelos osteoclastos e a formação óssea pelos osteoblastos. RANKL (ligante do receptor de ativação do fator nuclear  $\kappa$ B), seu receptor celular RANK (receptor de

---

ativação do fator nuclear  $\kappa$ B), e osteoprotegerina (OPG), que atua como seu receptor *decoy* de RANKL, são os componentes moleculares conhecidos do sistema de remodelação óssea. A ligação de RANKL a RANK, expresso nos precursores de osteoclastos, é o principal evento estimulatório para sua diferenciação e posterior ativação. Os efeitos de RANKL são regulados pela OPG, que inibe a reabsorção óssea impedindo a interação entre RANK e RANKL (TEITELBAUM, 2000; KATAGIRI e TAKAHASHI, 2002). Assim como previamente descrito para o sistema MMPs/TIMPs, alterações no balanço da expressão de RANKL e OPG estão relacionadas como componentes chave na patogênese de diversas patologias ósseas (RODAN e MARTIN, 2000; ROMAS, GILLESPIE e MARTIN, 2002; SEZER et al., 2003). Com relação às DP, estudos recentes têm demonstrado que níveis elevados de RANKL são encontrados no fluido gengival e no tecido periodontal em condições de doença. Tais estudos também sugerem que o balanço entre RANKL e OPG supostamente determina a atividade da doença (TENG et al., 2000; CROTTI et al., 2003; LIU et al., 2003; GARLET et al., 2004) (MOGI et al., 2004).

Tendo em vista o potencial envolvimento dos sistemas MMPs/TIMPs e RANKL/OPG na patogênese das DP, se torna importante o conhecimento dos fatores potencialmente envolvidos na regulação de tais fatores no microambiente periodontal. Diversos estudos têm sugerido que a produção de diversas citocinas pró e anti-inflamatórias nos tecidos periodontais seria um fator relevante para a determinação do curso e/ou severidade da doença, provavelmente regulando o balanço entre MMPs e TIMPs, e entre RANKL e OPG (TAUBMAN e KAWAI, 2001; UKAI et al., 2001; TENG, 2002; GARLET et al., 2003; YAMAZAKI, YOSHIE e SEYMOUR, 2003; GARLET et al., 2004; GEMMELL e SEYMOUR, 2004). Contudo, o papel individual das diversas citocinas e quimiocinas potencialmente envolvidas na patogênese da DP, os mecanismos moleculares envolvidos em sua função e sua relevância para a progressão da doença não são bem conhecidos.

Mediadores inflamatórios clássicos como o TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  têm sido descritos como indutores ou potencializadores da produção de MMPs e da expressão de fatores de diferenciação e ativação de osteoclastos, com consequente degradação de tecido conjuntivo e reabsorção óssea (GRAVES e COCHRAN, 2003). Porém, outros mediadores estão potencialmente envolvidos na imunomodulação das DP (KINANE e LAPPIN, 2001; TENG, 2003; YAMAZAKI, YOSHIE e SEYMOUR, 2003).

Um dos possíveis determinantes da severidade das DP seria a produção de citocinas pelos linfócitos T *helper* (Th), que atuariam controlando ou potencializando a reação

---

inflamatória nos tecidos periodontais (TENG, 2003; GEMMELL e SEYMOUR, 2004). Estudos recentes têm demonstrado que mediadores de ambos os tipos de resposta Th, Th1 e Th2, estão presentes no tecido periodontal, e que o balanço dessa resposta imune mista poderia estar relacionado ao grau de severidade da doença decorrente (BAKER, 2000; TENG, 2003; GEMMELL e SEYMOUR, 2004). Nesse sentido, estudos prévios têm demonstrado que em pacientes com periodontite agressiva (de caráter mais severo e de progressão mais rápida) a expressão de IFN- $\gamma$  está correlacionada com uma maior expressão de MMPs e fatores de diferenciação e ativação de osteoclastos; enquanto em pacientes com periodontite crônica (menos severa e de progressão mais lenta), uma elevada expressão de IL-10 está correlacionada a uma maior expressão dos inibidores fisiológicos de tais fatores, possivelmente atenuando a severidade da doença (GARLET et al., 2005; GARLET et al., 2006).

No entanto, analisar tais resultados e tentar correlacioná-los com o estado clínico dos pacientes é um processo complexo. Diferenças com relação à composição da microbiota periodontal relacionada à doença, época de estabelecimento, severidade e progressão da doença, influência genética, condições sistêmicas e ambientais, dificultam o estabelecimento direto de uma relação de causa e efeito. No intuito de facilitar o estudo da imunopatogênese das DP, modelos animais têm sido utilizados com sucesso, uma vez que tais variáveis podem ser controladas ou minimizadas, possibilitando a análise individual do papel de possíveis periodontopatógenos e de fatores da resposta do hospedeiro (GENCO, VAN DYKE e AMAR, 1998). Modelos utilizando camundongos apresentam vantagens como a ocorrência natural da doença em determinadas espécies, com prevalência e características comparáveis à doença humana, além da suscetibilidade à indução experimental de DP (GARRED et al., 1998; WIEBE et al., 2001). Além disso, camundongos apresentam custo relativamente baixo, são de fácil manejo e os processos inflamatórios e imunológicos são extensamente estudados e bem conhecidos. Suas características genéticas são bem conhecidas e manipuláveis, permitindo que aspectos muito bem definidos possam ser avaliados de maneira precisa, com o emprego de animais geneticamente modificados, substâncias bloqueadoras ou antagonistas, que em sua grande maioria são desenvolvidas experimentalmente em camundongos (GARRED et al., 1998). O modelo experimental empregado neste estudo e que tem sido empregado em estudos deste grupo de pesquisa foi baseado no desenvolvido por Baker e colaboradores (BAKER, 2000), diferindo apenas na utilização de um periodontopatógeno diferente, o *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*, considerado por muitos como o agente etiológico

---

principal da periodontite agressiva localizada, além de estar presente em um significativo número de casos de periodontite crônica (HENDERSON et al., 2002; MOMBELLI, CASAGNI e MADIANOS, 2002).

Na DP experimentalmente induzida em camundongos pela inoculação oral de *A. actinomycetemcomitans*, tem sido detectado durante todo o curso da doença a expressão de mediadores pró-inflamatórios clássicos (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), além de quimiocinas e citocinas do tipo Th1. Tal expressão está cineticamente correlacionada a uma intensa migração celular, a uma alta expressão de metaloproteases (MMP-1, -2 e -9) e fatores de diferenciação de osteoclastos (RANKL), e leva a rápida progressão da doença. Por outro lado, a expressão de citocinas e quimiocinas ligadas a respostas Th2 pode ser detectada a partir de 30 dias após a inoculação dos micro-organismos. Tal resposta Th2 leva ao aumento da expressão dos inibidores teciduais de metaloproteases (TIMP-1, -2 e -3) e de antagonistas da diferenciação e ativação de osteoclastos (OPG), atenuando a velocidade de progressão e a severidade da doença (GARLET et al., 2004; GARLET et al., 2007). De fato, tais resultados têm sido confirmados em estudos realizados em animais geneticamente deficientes de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-4 e IL-10 (GARLET et al., 2003). Além disso, dados de estudos prévios deste grupo de pesquisa vão de encontro aos resultados obtidos com biopsias de DP humana, e juntamente com outros dados da literatura previamente citados evidenciam os diferentes papéis das subpopulações Th1 e Th2 na imunopatogênese das DP (GARLET et al., 2005; GARLET et al., 2006).

Tais padrões de resposta podem ser determinados pela expressão seletiva de diferentes quimioatraentes nos tecidos periodontais. O processo de migração celular ocorre através de complexas interações de moléculas de adesão e quimioatraentes a seus respectivos receptores, envolvendo inicialmente o endotélio vascular e as células circulantes, e posteriormente, a interação dessas com a matriz extracelular conjuntiva e fatores quimiotáticos nela gerados (MANTOVANI, 1999). As quimiocinas compreendem uma grande família de citocinas quimiotáticas e são os principais fatores envolvidos na migração de leucócitos. Tais mediadores participam do processo inflamatório promovendo a ativação das integrinas, envolvidas na adesão das células ao vaso. Além disso, sua expressão localizada nos tecidos gera gradientes quimiotáticos responsáveis pelo direcionamento da migração celular e pela sua manutenção nos tecidos. Seus efeitos são exercidos pela ligação a uma classe de receptores expressos seletivamente na superfície dos diferentes tipos celulares, os receptores de quimiocinas.

---



Diversas quimiocinas têm sido identificadas e classificadas em distintas famílias de acordo com a disposição de resíduos conservados de cisteína presentes em sua região amino terminal. Tal classificação as separa em quatro famílias de quimiocinas: CC, CXC, C e CX<sub>3</sub>C (ROSSI e ZLOTNIK, 2000). A família das quimiocinas CC (ou ainda denominadas beta quimiocinas) recebe esta denominação por possuírem as duas primeiras cisteínas (CC), próximas ao domínio amino terminal, adjacente uma a outra, enquanto as CXC quimiocinas (ou alfa quimiocinas) apresentam um aminoácido (X) localizado entre as duas primeiras cisteínas próximas ao domínio amino terminal. Um terceiro grupo, designado C quimiocinas (ou gama), apresenta apenas um resíduo de cisteína na porção amino terminal. Finalmente, as CX<sub>3</sub>C quimiocinas (ou delta) que na verdade só apresenta um integrante, o qual apresenta três resíduos de aminoácidos separando as duas primeiras cisteínas (ROLLINS, 1997; GALE e MCCOLL, 1999).

As quimiocinas atuam a partir de um grupo de receptores celulares, denominados de receptores de quimiocinas, caracterizados por apresentar sete domínios transmembrânicos, e por estarem ligados à proteína G em sua porção carboxi terminal (SAUNDERS e TARBY, 1999). Com a ligação da quimiocina ao seu receptor, a sinalização decorrente é realizada pela proteína G, que através de suas subunidades desencadeia os eventos bioquímicos intracelulares que resultam nos efeitos que as quimiocinas exercem sobre as células (BOKOCH, 1995; SAUNDERS e TARBY, 1999; MURDOCH e FINN, 2000). A nomenclatura dos receptores de quimiocinas se dá pelo acréscimo da letra R ao final do nome da classe de quimiocinas à qual o receptor se liga, ou seja, os receptores das CC quimiocinas são denominados CCR, sendo o mesmo válido para as demais famílias. Certos receptores são associados com o fenótipo Th1, principalmente CXCR3 e CCR5, enquanto outros, como CCR4 e CCR8 com o fenótipo Th2 (O'GARRA, MCEVOY e ZLOTNIK, 1998). De fato, a expressão seletiva de receptores de quimiocinas pelas sub-populações de linfócitos Th leva a uma diferente responsividade destas células a certas quimiocinas. Apesar de certa redundância e promiscuidade na ligação entre quimiocinas e seus receptores, a combinação entre a expressão seletiva dos receptores, e a expressão seletiva de quimiocinas, é crucial para a determinação da especificidade da migração celular (MANTOVANI, 1999; ROSSI e ZLOTNIK, 2000). Exemplificando: células Th1 expressam caracteristicamente os receptores CCR5 e CXCR3, o que as torna responsivas a quimiocinas como CCL5 (RANTES) e CXCL10 (IP10); enquanto células Th2 expressam CCR4 e CCR8, e apresentam atividade quimiotática frente a CCL22 (MDC) e CCL17 (TARC). Dessa forma, a expressão local de

---

CCL5/CXCL10 ou CCL22/CCL17 determina a natureza das células Th que migrarão para tal tecido.

A migração de um ou outro tipo de célula Th influi diretamente no padrão de resposta imune e às consequências para os tecidos do hospedeiro (ROSSI e ZLOTNIK, 2000; LUTHER e CYSTER, 2001) uma vez que as células Th1 se tornam capazes de secretar IFN- $\gamma$ , sua citocina prototípica (BROMBACHER, KASTELEIN e ALBER, 2003; SZABO et al., 2003). O IFN- $\gamma$  apresenta diversos efeitos no sistema imune, sendo a principal citocina ativadora de macrófagos, estimulando a fagocitose, captação e apresentação de antígenos, produção de citocinas inflamatórias e mediadores antimicrobianos, como o óxido nítrico (NO) (O'GARRA, 1989b, 1989a; BOGDAN, 2000, 2001; SZABO et al., 2003), apresentando desta forma, um papel crítico na imunidade protetora contra diversos patógenos intracelulares. Além do papel protetor, as células Th1 também têm importante participação na patogênese da DP, uma vez que o IFN- $\gamma$  parece ser a principal citocina produzida por células Th1 na DP, e diversos estudos têm demonstrado uma associação entre IFN- $\gamma$  e lesões progressivas ou formas mais severas de DP (EBERSOLE e TAUBMAN, 1994; ROBERTS, MCCAFFERY e MICHALEK, 1997; SALVI et al., 1998; SIGUSCH et al., 1998; KAWAI et al., 2000; TAKEICHI et al., 2000; UKAI et al., 2001; GARLET et al., 2003; GORSKA et al., 2003; GARLET et al., 2004).

Por outro lado, a presença das células Th2, produzindo sua citocina prototípica, a IL-4, pode exercer efeitos estimulatórios ou supressivos em diferentes tipos celulares. As propriedades supressoras e anti-inflamatórias de IL-4 são em grande parte devidas a sua capacidade de inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias e IFN- $\gamma$ , impedindo dessa forma a polarização de células Th1 (HAMILTON et al., 1999; NELMS et al., 1999; AGNELLO et al., 2003). Por outro lado, a IL-4 promove a maturação de células Th2 e age como fator de crescimento de células B, estimulando preferencialmente respostas imunológicas do tipo humoral, e favorecendo a mudança de classe para a produção de IgG1 e IgE (NELMS et al., 1999; AGNELLO et al., 2003). A IL-4 também pode agir amplificando respostas do tipo Th2 através da expressão de quimiocinas que levam ao recrutamento outras células Th2 (HAMILTON, OHMORI e TEBO, 2002; YAMASHITA et al., 2002), ou estimulando a produção de outras citocinas que podem atuar de forma complementar ou sinérgica a IL-4 (BRUBAKER e MONTANER, 2001; JARNICKI e FALLON, 2003; PESTKA et al., 2004). Uma dessas citocinas, a IL-10, também apresenta propriedades anti-inflamatórias, reduzindo a expressão de moléculas coestimulatórias em células apresentadoras de antígenos e inibindo a

---

síntese de citocinas inflamatórias e Th1 por células T, NK e macrófagos (HSU, MOORE e SPITS, 1992; ROUSSET et al., 1992; MOORE et al., 1993; HAMILTON et al., 1999; PESTKA et al., 2004). Tal citocina está geralmente associada a uma significativa redução na reação inflamatória, mas uma vez que interfere na resposta imune celular mediada por TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , a produção de IL-10 pode prejudicar eliminação de agentes infecciosos, levando a latência de infecções (BELKAID et al., 2002; MITTRUCKER e KAUFMANN, 2004; SAKAGUCHI, 2004).

As propriedades regulatórias tanto de IL-4 como de IL-10 também incluem a inibição da produção de MMPs e fatores osteoclastogênicos, além de estimular a produção de seus respectivos antagonistas TIMPs e OPG (MERTZ et al., 1994; REYNOLDS, 1996; BESSIS e BOISSIER, 2001; BAKER, EDWARDS e MURPHY, 2002; CHAKRABORTI et al., 2003; VISSE e NAGASE, 2003; SAIDENBERG-KERMANAC'H et al., 2004; THEOLEYRE et al., 2004). Tais estudos sugerem que IL-4 e IL-10 podem apresentar um efeito protetor com relação à destruição tecidual nas DP.

Assim, a produção local de quimiocinas atrativas para células Th1 ou Th2 interfere diretamente sobre o balanço entre estes dois perfis de resposta imune, sendo a produção de suas citocinas características, crucial para o destino dos tecidos periodontais.

Com relação ao processo de quimioatração e polarização da resposta imune, diversas quimiocinas e receptores de quimiocinas, como CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL5 (RANTES) e seu receptor CCR5, têm sido identificadas nos tecidos periodontais inflamados, enquanto sua expressão em condições de saúde periodontal é mínima ou inexistente (TONETTI et al., 1994; GAMONAL et al., 2000; GAMONAL et al., 2001; GEMMELL, CARTER e SEYMOUR, 2001). A quimiocina CCL3 exibe atividade quimiotática e de ativação celular através da ligação ao receptor CCR5, expresso por monócitos, células dendríticas, células NK e linfócitos Th1. CCL4 e CCL5 também exercem suas funções quimiotáticas pela ligação ao receptor CCR5, sendo dessa forma importantes para a migração de linfócitos, macrófagos e células dendríticas (MANTOVANI, 1999; ROSSI e ZLOTNIK, 2000; LUTHER e CYSTER, 2001). Recentemente foi demonstrado por reações de imunohistoquímica que células T, macrófagos e células dendríticas no tecido gengival inflamado expressam CCR5 (JOTWANI, MUTHUKURU e CUTLER, 2004), porém, o exato fenótipo de tais células permanece desconhecido. Tais tipos celulares são caracteristicamente encontrados durante a DP, e potencialmente envolvidos em sua patogênese (KINANE e LAPPIN, 2001; GRAVES e COCHRAN, 2003). Um estudo recente demonstra a associação

---

entre altos níveis de CCL5 e CCR5 nos tecidos periodontais de ratos idosos, e sugere seu envolvimento na destruição tecidual apresentada por tais animais (KIM et al., 2006). Tais resultados vêm de encontro a resultados anteriores deste grupo de pesquisa, nos quais foi demonstrado que pacientes com periodontite agressiva apresentam uma intensa expressão da quimiocina CCL3 e de seu receptor CCR5, associada a maior expressão local de IFN- $\gamma$  (GARLET et al., 2003). Por outro lado, pacientes com periodontite crônica apresentam uma maior expressão de quimiocinas do tipo Th2, associada a uma expressão predominante de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (GARLET et al., 2005). Além disso, CCL3 e CCR5 são expressos no curso da DP experimental, apresentando correlação positiva com a expressão de mediadores diretamente envolvidos na patogênese da doença, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MMPs e RANKL (GARLET et al., 2004; GARLET et al., 2007). Uma vez que o padrão de quimiocinas produzido localmente supostamente determina uma quimioatração seletiva de subpopulações Th para os tecidos periodontais, tais resultados sugerem que quimiocinas e seus receptores teriam influência direta sobre o curso da doença.

De fato, o papel de quimiocinas e seus receptores, com destaque para CCL3 e CCR5, tem sido claramente demonstrado na artrite reumatóide (AR), e em diversas condições patológicas como encefalomielite autoimune experimental, doença de chagas, entre outras (SATO et al., 1999; LINDELL et al., 2001; TEIXEIRA, GAZZINELLI e SILVA, 2002). A AR possui características comuns com as DP, como a cronicidade da resposta inflamatória e a ocorrência de reabsorção óssea, além da maior incidência e severidade das DP nos pacientes com AR (MERCADO et al., 2001; BARTOLD, MARSHALL e HAYNES, 2005). A expressão de CCL3 e CCR5 se mostra aumentada no tecido sinovial inflamado, assim como o número de células CCR5 nas lesões artríticas é extremamente elevado (WEDDERBURN et al., 2000; YUAN et al., 2001; WANG e LIU, 2003). Além de seu papel na quimioatração de leucócitos, a CCL3 tem sido descrita como indutora da expressão de MMPs e como fator quimiotático e de diferenciação de osteoclastos (SCHEVEN et al., 1999; ROBINSON, SCOTT e BALKWILL, 2002; ROODMAN e CHOI, 2004). Os efeitos da CCL3 sobre os osteoclastos parecem ser mediados pelos receptores CCR5 e/ou CCR1 (OBA et al., 2005), reforçando a ideia que tais fatores podem estar diretamente relacionados à atividade de reabsorção óssea. Apesar de certa controvérsia na literatura, a mutação delta32 no gene de CCR5 está supostamente ligada a uma redução na presença de fator reumatóide e na severidade da AR (GARRED et al., 1998; ZAPICO et al., 2000). Entretanto, um estudo recente não demonstra associação entre o polimorfismo delta32 de CCR5 e a incidência de

---

DP, porém sua relevância com relação à severidade da doença não foi analisada pelos autores (FOLWACZNY et al., 2003). Controvérsias genéticas à parte, estudos demonstram que a utilização de anticorpos neutralizantes anti-CCL3, de animais geneticamente deficientes de CCL3, com deleção ou mutações no receptor CCR5, leva a atenuação da severidade da artrite experimental (e em diversos outros modelos experimentais, como a encefalomielite auto-imune experimental), demonstrando claramente seu papel na patogênese da doença (YUAN et al., 2001; YANG et al., 2002; PROUDFOOT et al., 2003; MAURER e VON STEBUT, 2004). Essas observações sugerem que o desenvolvimento de estratégias terapêuticas visando à inibição das funções de CCL3 e CCR5 é extremamente promissor. De fato, o tratamento com o antagonista de CCR5 Met-RANTES (PROUDFOOT et al., 1996) leva à atenuação do processo inflamatório em diversos modelos experimentais, incluindo a AR (PROUDFOOT et al., 1996; PROUDFOOT et al., 2003). Além disso, uma vez que CCR5 é um co-receptor para a invasão celular pelo vírus HIV, a pesquisa por inibidores de CCR5 tem sido intensa, já sendo utilizados em *trials* clínicos em humanos (PROUDFOOT et al., 1996; PROUDFOOT et al., 2003).

Além da modulação da severidade da doença, outro aspecto importante com relação à patogênese das DP é o controle da infecção bacteriana, cujos mecanismos não são conhecidos. Nas DP, a presença de micro-organismos invasivos nos tecidos periodontais, além de propiciar acesso e disseminação pelo organismo, leva a uma resposta sistêmica descrita como fator modificador da saúde sistêmica dos pacientes, e até mesmo predispondo a ocorrência de diversas patologias (CRAIG et al., 2003; IDE et al., 2004). Resultados deste grupo demonstram que a ausência de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  resulta em um grande aumento da carga bacteriana nos tecidos periodontais e a uma intensa resposta de fase aguda (GARLET et al., 2007; GARLET et al., 2008). De fato, a ativação de macrófagos por tais citocinas resulta na ativação de iNOS e produção de óxido nítrico, levando ao controle de diversos micro-organismos, incluindo periodontopatógenos (BLIX e HELGELAND, 1998; ALLAKER et al., 2001; SILVA, MACHADO e MARTINS, 2003). Recentemente, participação de células CCR5+ tem sido descrita em tal via de controle microbiano (ALIBERTI et al., 1999; TEIXEIRA, GAZZINELLI e SILVA, 2002; SILVA, MACHADO e MARTINS, 2003), sugerindo seu potencial papel no controle de periodontopatógenos.

Embora diversos estudos tenham demonstrado a presença de quimiocinas nos tecidos periodontais em condições patológicas, até agora não se pode estabelecer uma relação de causa-efeito entre sua presença e o processo de doença.

---

O conhecimento do papel dos mecanismos pelos quais quimiocinas e seus receptores estão envolvidos na imunopatogênese das doenças periodontais certamente será útil não apenas para o entendimento dos mecanismos que levam a resistência à doença ou ao dano tecidual decorrente da resposta, mas também poderá contribuir para o desenvolvimento de metodologias de diagnóstico mais precisas e de estratégias terapêuticas para tais patologias.

---

***P***roposição









## 2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o papel das células CCR5+ na imunopatogênese da doença periodontal experimental induzida em camundongos pela inoculação oral de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Detalhadamente, os objetivos foram:

1- Analisar o papel do CCR5 na modulação da resposta inflamatória e da reabsorção óssea alveolar durante o curso da doença periodontal experimentalmente induzida.

2- Analisar o papel do CCR5 no controle da infecção periodontal por *A. actinomycetemcomitans*.

---







# ***Material & Métodos***









### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais de experimentação**

Foram utilizados camundongos C57BL/6 *wild type* (WT) e C57BL/6 CCR5-*Knockout* (KO), machos, com idade aproximada de 8 semanas, obtidos junto ao biotério da Área de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, onde foram criados e posteriormente mantidos no biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP. Os animais foram mantidos em micro isoladores individuais, alimentados normalmente com ração e água, sendo que apenas nos dias das inoculações dos micro-organismos a alimentação foi suprimida. Os grupos experimentais foram compostos de 21 a 30 animais, nos quais 3 camundongos foram utilizados em cada tempo para as diferentes análises. O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da FOB/USP sob o número 0016/2007 (ANEXO A).

#### **3.2 Protocolo de indução de doença periodontal**

O protocolo de indução da doença periodontal foi realizado como previamente descrito (GARLET et al., 2004; GARLET et al., 2007). Resumidamente, *A. actinomycetemcomitans* JP2 foi utilizada nesse estudo, sendo cultivada em jarro de

---

---

anaerobiose em meio ágar suplementado (TSBV). Uma vez colhidos da placa, os microorganismos foram transferidos para um tubo de microcentrífuga com 100 µl de PBS, e comparando-se com uma escala padrão de densidade bacteriana em meio líquido, foi determinada então a concentração, em UFC da solução. A solução foi diluída de modo a atingir a concentração de 10<sup>9</sup> UFC em 100 µl de PBS. Os grupos de animais infectados foram submetidos ao protocolo que consiste da inoculação oral de 10<sup>9</sup> UFC em 100 µl de PBS, acrescida de 2% de carboximetilcelulose, sendo esta solução aplicada diretamente na cavidade oral dos animais com o auxílio de um micropipetador automático. Após 48 horas e 96 horas, o procedimento de inoculação oral foi repetido. Grupos controle (animais *sham*-infectados) foram criados a partir da inoculação oral de 100 µl de uma solução de PBS a 2% de carboximetilcelulose, com metodologia semelhante à descrita para o grupo anterior. Como controles negativos, para cada um dos fatores avaliados, foram considerados os valores expressos no tempo zero (T<sub>0</sub>) dos animais não infectados, pois de acordo com experimentos prévios deste grupo de pesquisa (GARLET et al., 2005; GARLET et al., 2006; GARLET et al., 2007), sabe-se que não ocorrem alterações de nenhuma espécie entre os tempos zero e os demais tempos experimentais nos grupos não infectados.

### 3.3 Coleta de amostras

As amostras de tecido mole analisadas consistiram do tecido gengival palatino. Para sua remoção, foi realizada uma incisão no palato, distal aos molares e perpendicular à linha média. A partir da incisão o tecido palatino foi descolado em toda a sua extensão com um descolador de Molt, até a mesial dos molares, sendo então realizada uma nova incisão de modo a remover o tecido. Em cada tempo, biópsias de cada grupo foram colocadas em Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA), para as análises de expressão gênica, congeladas em nitrogênio líquido e conservadas à temperatura de -70 °C (para análise de MPO e ELISA). Conforme estudos prévios (GARLET et al., 2004; GARLET et al., 2007), as datas para sacrifício dos animais e coleta de amostras foram 0h, 7, 15, 30 e 60 dias após a inoculação inicial de *A. actinomycetemcomitans*.

---

### 3.4 Avaliação da reabsorção óssea alveolar

A análise da reabsorção óssea alveolar foi realizada como previamente descrito (GARLET et al., 2003; GARLET et al., 2007). Resumidamente, para a avaliação do nível ósseo periodontal, a peça cirúrgica contendo os processos alveolares, dentes e palato ósseo, foi separada em duas hemi-arcadas pela ruptura da sutura palatina. As peças cirúrgicas foram então tratadas com solução de peróxido de hidrogênio 30 volumes a 50% por 24 horas para a remoção dos tecidos moles. O material foi então fotografado em lupa de dissecação, com aumento de 20 vezes (Zeiss, Göttingen, Alemanha), com a face oclusal dos molares posicionada perpendicularmente à base da lupa, e de modo a ser fotografada a face palatina. As imagens foram codificadas, de modo a que, quando foi realizada a medição, o examinador não saiba a que grupo ou tempo a amostra fazia parte. Com o auxílio do programa de análise de imagens ImageToll 2.0 (The University of Texas Health Science Center, San Antonio, USA), foi realizada a medição da área compreendida entre a junção amelo-cementária e a crista óssea alveolar, em unidades arbitrárias de área (UAA), correspondentes aos *pixels* contidos na área selecionada. As medições foram realizadas por um único examinador calibrado. Para cada animal, a perda óssea alveolar foi definida como a média da área total entre a junção amelo-cementária e a crista óssea alveolar, avaliada na face palatina dos 6 dentes posteriores. Para as análises da reabsorção óssea alveolar, foram analisadas maxilas provenientes de 3 camundongos de cada grupo experimental, coletadas nos tempos de 0h, 7, 15, 30 e 60 dias após a infecção, de três experimentos independentes.

### 3.5 Análise quantitativa e qualitativa do infiltrado inflamatório

A análise quantitativa e fenotípica de células extraídas dos tecidos periodontais foi realizada por citometria de fluxo, como previamente descrito (GARLET et al., 2007). As amostras de tecido foram separadas e depositadas em placas de 12 poços (Corning Incorporated, Corning, EUA) contendo 1 ml de meio incompleto (RPMI; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA) e liberase (1:100) (Liberase Blendzyme CI; Roche Applied Science,

---

---

Rotkreuz, Suíça) e então incubadas a 37 °C durante 1 hora. Após a incubação, foram colocados em trituradores (Medicons; BD Biosciences, San Jose, EUA) juntamente com meio completo a 10% e DNase 0,05% (DN-25; Sigma-Aldrich) e triturados no Medimachine (BD Biosciences) por 4 minutos. O líquido foi aspirado com uma seringa de 10 ml, filtrado (Filcons; BD Biosciences) em tubo tipo Falcon de 15 ml e adicionados 10 ml de meio completo e DNase. A suspensão celular foi centrifugada a 500 x g. O *pellet* foi ressuspenso em 1 ml de meio completo a 10% e células foram então contadas em câmara de Neubauer, sendo que o número absoluto de leucócitos foi utilizado para a análise quantitativa das células inflamatórias.

Para as análises de citometria de fluxo,  $1 \times 10^6$  células foram filtradas em filtro de 50  $\mu\text{m}$ , incubadas com anticorpos bloqueadores da porção Fc de imunoglobulinas (anti-CD16/CD32 - clone 2.4G2; BD Biosciences) por 45 minutos a 4 °C e, em seguida, com os anticorpos contra determinantes específicos por 30 minutos a 4 °C. Para a fenotipagem celular foram utilizados anticorpos conjugados a PE ou FITC específicos para os seguintes marcadores: CD3, CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CCR8, CXCR3, GR1, F4/80, RANKL, assim como seus respectivos isotipos controle (BD Biosciences). As células foram centrifugadas, ressuspenso em PBS-formol e a leitura realizada em FACScan (FACScan and CellQuest software; BD Biosciences). As células foram adquiridas em FACsorting (BD Biosciences), utilizando os canais de fluorescência 1 (FL1) para FITC e canal 2 (FL2) para PE. As análises foram feitas usando programas CellQuest (CellQuest software; BD Biosciences) e WinMDI (WinMDI v2.8; The Scripps Research Institute, La Jolla, EUA) os quais permitem analisar todas as células adquiridas (10000/amostra) ou apenas determinadas populações, individualizadas por janelas estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL). O número absoluto das células CD3+, CCR1+, CCR2+, CCR4+, CCR5+, CCR8+, CXCR3+, GR1+ e F4/80+ foi calculado proporcionalmente em relação ao número de células totais.

Para as análises quantitativa e qualitativa das células inflamatórias nos tecidos periodontais foi utilizado um *pool* contendo o tecido gengival palatino de 3 animais de cada grupo experimental, coletados nos tempos de 0h, 7, 15, 30 e 60 dias após a infecção. Os resultados apresentados representam os valores da média  $\pm$  SD, do número de células por animal, provenientes de três experimentos independentes.

---

### 3.6 Extração de RNA e Transcrição Reversa

A extração do RNA total foi realizada com o reagente Trizol, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante como previamente descrito (GARLET et al., 2006). Brevemente, para cada amostra, em um tubo de micro-centrífuga, foi adicionado o reagente Trizol (1 ml para 1 mg de tecido), sendo agitado por 30 segundos e deixadas à temperatura ambiente por 5 minutos. Para cada 1 ml da suspensão foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio (Sigma-Aldrich) e centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, ao qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol, sofrendo agitação em *vortex* e incubado por 20 minutos a -20 °C para precipitar o RNA da fase aquosa. Novamente os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado em etanol 100%, sendo então seco a temperatura ambiente, com o tubo invertido sobre um papel de filtro. As amostras de RNA foram suspensas em 50 µl de água deionizada e livre de RNase, sendo então as amostras armazenadas a -70 °C. Uma alíquota de 5 µl foi utilizada para a obtenção da concentração de RNA/µl nas amostras, determinada usando o aparelho GeneQuant (Pharmacia Amersham Biosciences, Piscataway, EUA). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado através de uma reação de transcrição reversa, com a utilização de uma transcriptase reversa (Superscript II; Gibco Life Tech, Carlsbad, EUA) utilizando 5µg de RNA, de acordo com as especificações do fabricante.

### 3.7 Reações de RealTime-PCR

Uma vez confirmada a positividade da detecção de beta-actina por RT-PCR, a expressão quantitativa de genes de citocinas e quimiocinas, assim como a quantificação da carga bacteriana no tecido periodontal, foram analisadas através de reações de RealTime-PCR, utilizando-se o sistema SYBRGreen em um aparelho MiniOpticon (BioRad, Hercules, EUA) (GARLET et al., 2006). *Primers* adequados para tais reações (ANEXO B) foram criados a partir do programa Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e tais

---

reações já estavam devidamente padronizadas e utilizadas na rotina do laboratório. Esse sistema realiza as reações de amplificação e detecção e quantifica as amostras (ABI Prism Software; Applied Biosystems) através de nucleases fluorogênicas utilizadas na reação, sendo tal expressão normalizada com base em controles endógenos. O DNA complementar sintetizado a partir do RNA mensageiro foi utilizado juntamente com reagentes SYBR Green, como determinado pelo fabricante. As reações compreenderam 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C, além de um ciclo final de vinte minutos, com temperatura crescente de 60 a 95 °C empregado para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor de CT (cycle threshold – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atingiu um dado limiar, que permitisse a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Para as reações de RealTime-PCR, foram utilizadas independentemente, amostras de cDNA proveniente do RNA extraído do tecido periodontal de 3 animais de cada grupo experimental, coletados nos tempos de 0h, 7, 15, 30 e 60 dias após a infecção.

### **3.8 Dosagem de RANKL e OPG por ELISA**

A produção de RANKL e OPG nos tecidos periodontais também foi analisada por ELISA, como previamente descrito (TALVANI et al., 2003). Para tanto, o tecido gengival palatino foi coletado (conforme previamente descrito), pesado, e homogeneizado com o homogeneizador de tecidos (UltraTurrax 8.0; IKA, Staufen, Alemanha) em solução de PBS 1X contendo inibidor enzimático (Protease Inhibitor; Boehringer Mannheim, Alemanha). O homogeneizado foi centrifugado a 2500 g por 10 minutos a 4 °C, sendo então o sobrenadante coletado e armazenado a -70 °C até a realização dos ensaios de ELISA. RANKL e OPG foram quantificados utilizando kits Quantikine (R&D Systems, Minneapolis, EUA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. A concentração de RANKL e OPG nos sobrenadantes de tecido periodontal foi determinada a partir dos valores obtidos com as respectivas curvas-padrão. Os níveis de sensibilidade dos kits utilizados eram de: RANKL >3 pg/ml e OPG >4 pg/ml. Para os ensaios de ELISA foi utilizado um *pool* de tecido gengival palatino, proveniente de 5 camundongos por grupo, sacrificados nos tempos de 0h, 7 e 30 dias

---



após a infecção. Os resultados apresentados são expressos como valores da média  $\pm$  SD de picogramas de citocina por miligrama de tecido, e representam os valores de duplicatas de cada amostra, obtidos em dois experimentos independentes.

### 3.9 Dosagem de mieloperoxidase (MPO)

A análise da atividade de MPO nos tecidos periodontais foi realizada como previamente descrito (SOUZA et al., 2004). Para tanto, o tecido periodontal palatino foi homogeneizado em tampão contendo NaCl (1,0M), NaPO<sub>4</sub> (0,02M), NaEDTA (0,015M), gelado e em pH 4,7. O homogenato foi centrifugado a 3000 g por 15 minutos, sendo então submetido a choque hipotônico com 900  $\mu$ l de NaCl 0,2%, seguido por 900  $\mu$ l de NaCl 1,6% e glicose 5%. Depois de novamente centrifugado, o *pellet* foi ressuspenseo em tampão NaPO<sub>4</sub> (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de tetrametilbenzidina (1, $\mu$ M) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5  $\mu$ M). Em seguida, o homogenato foi submetido a congelamento e descongelamento por 3 vezes, e centrifugado por 10000 g por 15 minutos a 4 °C. A determinação da atividade de MPO foi realizada por meio da análise da densidade óptica (DO) a 450 nm, utilizando-se tetrametilbenzidina (1,6  $\mu$ M) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5  $\mu$ M). Para a dosagem de MPO, foi utilizado um *pool* de tecido gengival palatino, proveniente de 5 camundongos por grupo, sacrificados nos tempos de 0h, 15 e 60 dias após a infecção. Os resultados representam os valores de duplicatas de cada amostra, obtidos em dois experimentos independentes.

### 3.10 Detecção e quantificação de *A. actinomycetemcomitans*

Para a quantificação de *A. actinomycetemcomitans*, foram utilizadas reações de RealTime-PCR. A extração de DNA bacteriano foi realizada conforme método previamente descrito (GARLET et al., 2003). Após a coleta em água mili-Q estéril, as amostras foram homogeneizadas através da utilização de um triturador de tecidos (UltraTurrax 8.0; IKA), centrifugadas a 13000 g por 10 minutos, sendo o sedimento ressuspensado em 500  $\mu$ l de água mili-Q estéril, e novamente centrifugadas e ressuspensadas em 500  $\mu$ l de água mili-Q estéril.

---

As amostras foram então fervidas por 10 minutos, e novamente centrifugadas. Após a centrifugação, as amostras foram ressuspendidas em 10 µl de água mili-Q estéril. Para a quantificação de *A. actinomycetemcomitans* foram utilizados 12,5 µl do reagente SYBRGreen Master Mix (Invitrogen), 5 µl da solução de DNA bacteriano, 4 µl de água MiliQ tratada com DEPC, e 1 µl da solução contendo cada *primer* (ANEXO B). A reação compreendeu basicamente 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C, além de um ciclo final de vinte minutos, com temperatura crescente de 60 a 95 °C, empregada para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor de CT (*cycle threshold* – ou ciclo limiar), como previamente descrito. Para a normalização dos valores do DNA de *A. actinomycetemcomitans*, foram utilizados os valores do peso do fragmento de tecido periodontal utilizado para a extração.

### 3.11 Análise estatística

Análises entre três ou mais grupos e tempos experimentais, como os dados relativos ao número de células inflamatórias, níveis de reabsorção óssea, níveis de expressão de mRNA, dos grupos de animais C57BL/6 WT e CCR5 KO infectados e controles (animais *sham*-infectados), foram submetidos ao teste estatístico One-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Análises entre apenas dois grupos ou amostras foram realizadas através do teste t de Student. Correlações entre células CCR5 positivas e a expressão dos diversos fatores analisados foram analisadas através de regressão linear. Para todas as análises, valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Todos os testes estatísticos foram aplicados através do programa GraphPad Prism 5 (GraphPad, San Diego, EUA).

---

## ***Resultados***





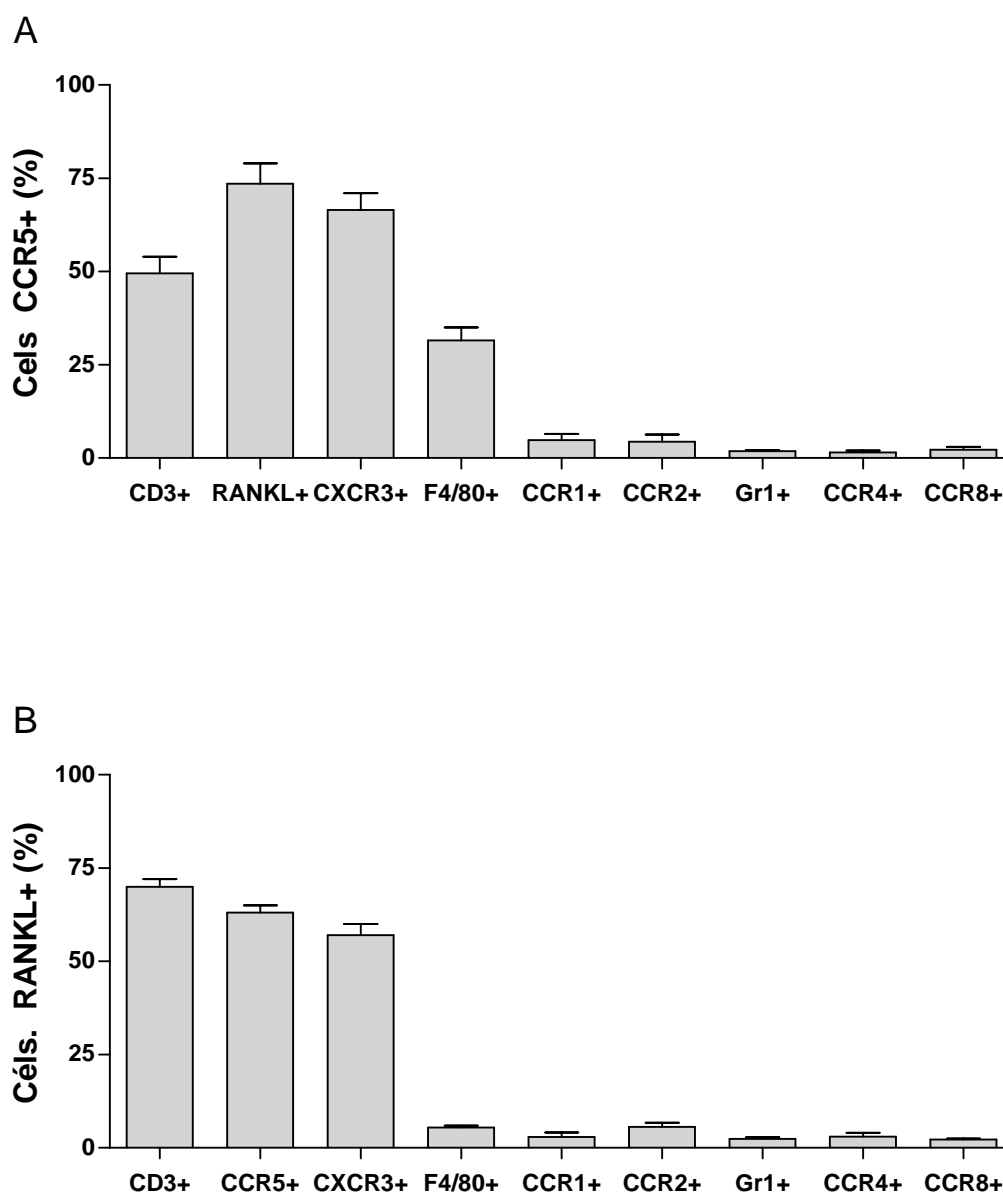


## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise fenotípica das células CCR5+ extraídas dos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*

Buscando estabelecer qual o papel das células CCR5+ na patogênese da periodontite experimental, o primeiro passo foi a análise fenotípica das células CCR5+ presentes no infiltrado inflamatório nos tecidos periodontais. Para tanto, amostras de tecido periodontal palatino de animais C57BL/6 WT, submetidos ao protocolo de indução de DP foram coletadas 30 dias pós-infecção, submetidas à digestão enzimática, os leucócitos separados e analisados fenotipicamente através de citometria de fluxo (Fig. 1). Os resultados demonstram que a maior parte das células que expressavam CCR5 eram positivas para o CD3 (49,5%), um marcador de células T; co-expressavam CXCR3 (66,5%), um marcador de células T *helper* do subtipo Th1, sugerindo assim que a maioria das células CCR5+ são células Th1. Além disso, uma alta porcentagem das células CCR5+ expressava RANKL (73,5%) (Fig. 1A). 31,5% das células CCR5+ co-expressavam o marcador de superfície para macrófagos F4/80, e apenas poucas células expressavam outros marcadores fenotípicos de macrófagos como CCR1 (4,75%) e CCR2 (4,4%). Uma quantidade pequena de células expressava marcadores para outros tipos celulares como neutrófilos (Gr1, 1,85%) e células Th2 (CCR4, 1,5% e CCR8, 2,25%). Uma análise subsequente demonstrou que do total de células que expressavam RANKL, a maioria também expressava CD3 (70%), CCR5 (63%) e CXCR3 (57%), confirmando assim, que a maioria das células que expressavam RANKL eram linfócitos Th1 (Fig. 1B).

---



**Figura 1 – Análise fenotípica dos leucócitos extraídos dos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*.** Amostras de tecido periodontal palatino de camundongos C57BL/6 WT submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A. actinomycetemcomitans* foram coletadas, ao tempo de 30 dias, submetidas à digestão enzimática, e a contagem de células realizada em câmara de Neubauer. Para as análises de citometria de fluxo,  $1 \times 10^6$  cel/ml células foram incubadas com anticorpos conjugados a fluorocromos específicos para os seguintes marcadores: CD3, CCR5, CXCR3, F4/80, CCR1, CCR2, Gr1, CCR4, CCR8, e RANKL e a análise realizada em FACScan utilizando-se parâmetros de tamanho (FSC), granularidade (SSC), e fluorescência (FL1 e FL2). A porcentagem de células CCR5+ e RANKL+ que coexpressavam os marcadores CD3, CCR5, CXC3, F4/80, CCR1, CCR2, Gr1, CCR4, CCR8 e RANKL, foram calculados proporcionalmente em relação ao número de células CCR5+ ou RANKL+ totais.



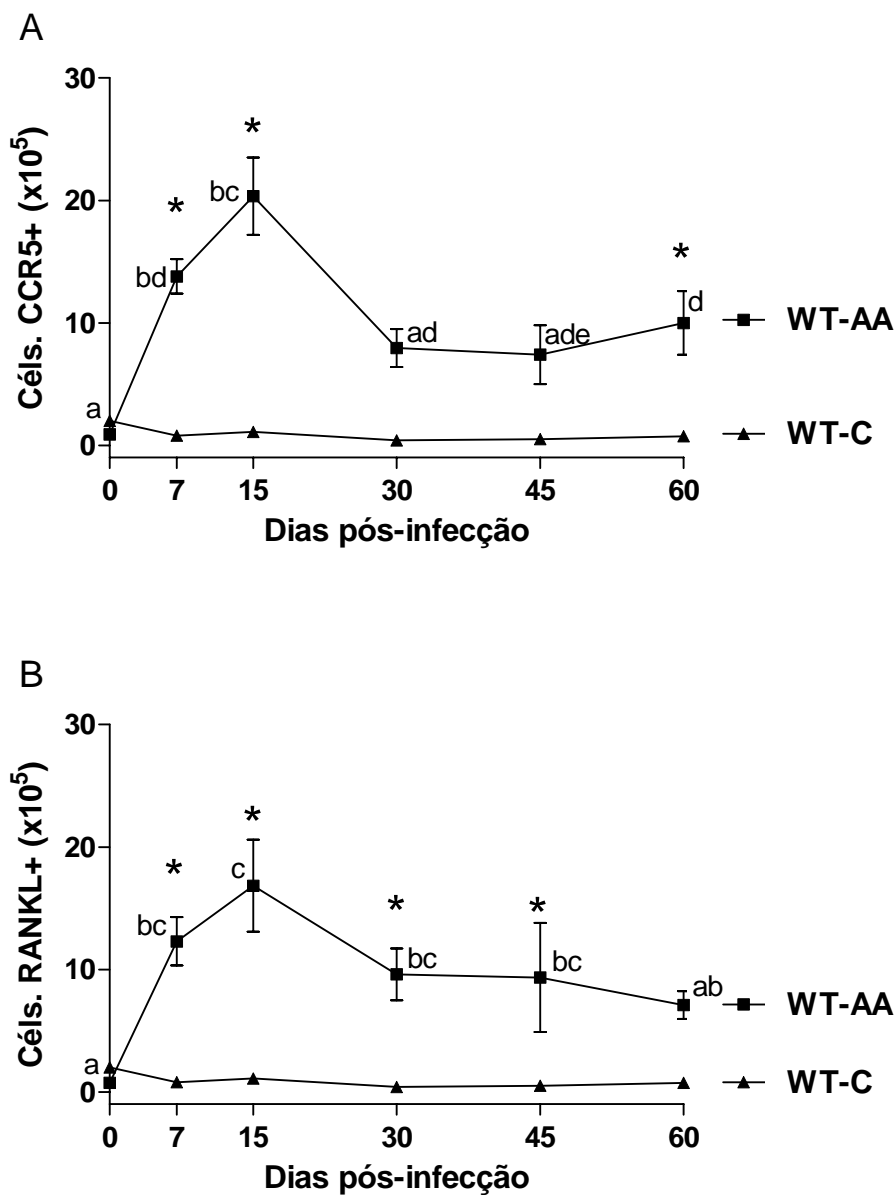
#### **4.2 Análise cinética da migração das células CCR5+ e RANKL+ para os tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans***

Tendo em vista a co-expressão de RANKL pelas células CCR5+, o que aponta para um importante papel deste tipo celular no desenvolvimento da periodontite experimental, foi analisada na sequência, a cinética de migração destas células após a infecção periodontal.

A análise da migração das células positivas para CCR5 e para RANKL dos camundongos infectados demonstrou diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) quando comparadas aos animais controle (WT *sham*-infectados) e controle negativo ( $T_0$ ) nos tempos de 7, 15 e 60 dias e 7, 15, 30 e 45 dias respectivamente (Fig. 2).

Uma análise de regressão linear demonstrou uma cinética paralela ( $r^2 = 0,8949$ ;  $P < 0,05$ ) de migração das células CCR5+ e RANKL+ para os tecidos periodontais dos animais WT infectados.

---



**Figura 2.** Análise cinética das células CCR5+ e RANKL+ extraídas dos tecidos periodontais de camundongos C57BL/6 WT infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Células extraídas nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias após infecção com *A. actinomycetemcomitans* e analisadas através de citometria de fluxo. Os resultados representam os valores da média  $\pm$  SD. WT-AA = Animais C57BL/6 *wild type* infectados; WT-C = Animais controle *sham*-infectados. \* $P < 0,05$ ; One-way ANOVA, WT-AA vs WT-C no mesmo tempo experimental. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os tempos dentro do mesmo grupo experimental ( $P < 0,05$ ; One-way ANOVA). Valores do tempo zero são considerados como os valores do controle negativo.

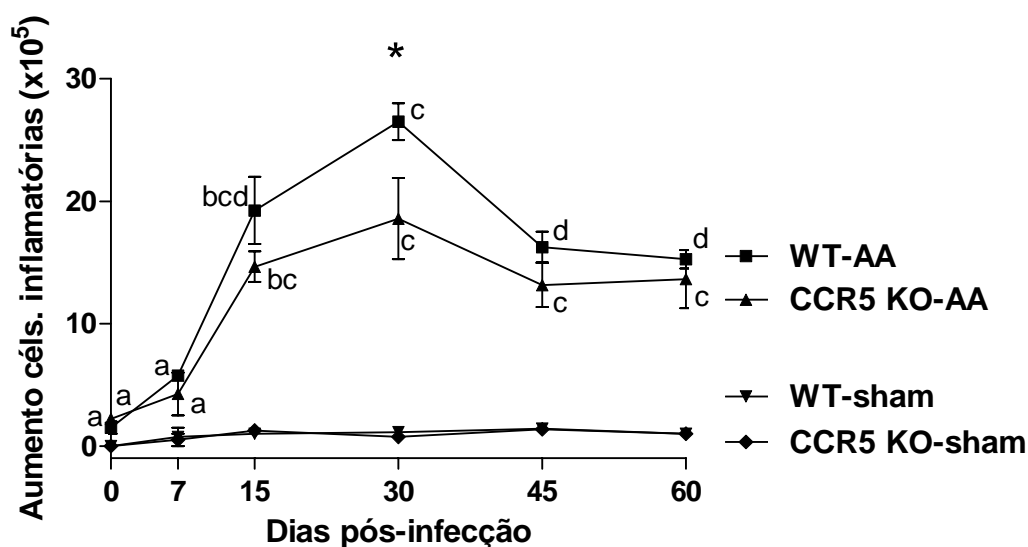
### **4.3 Papel do CCR5 na modulação da reação inflamatória e perda óssea alveolar induzida por *A. actinomycetemcomitans***

Buscando investigar o papel do CCR5 na determinação da severidade da doença periodontal, inicialmente analisou-se a resposta inflamatória e a reabsorção óssea alveolar em camundongos CCR5-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Os resultados demonstram uma significativa redução no número absoluto de leucócitos extraídos do tecido gengival dos animais CCR5-KO aos 30 dias ( $P < 0,05$ ) após a infecção, quando comparados aos animais WT infectados com *A. actinomycetemcomitans* (Fig. 3). Nos dias 15, 45 e 60 foi observada diminuição no número de células, porém sem diferenças estatisticamente significativas. Os animais CCR5-KO *sham*-infectados, WT *sham*-infectados e controles negativos ( $T_0$ ), não apresentaram variações no número de células inflamatórias.

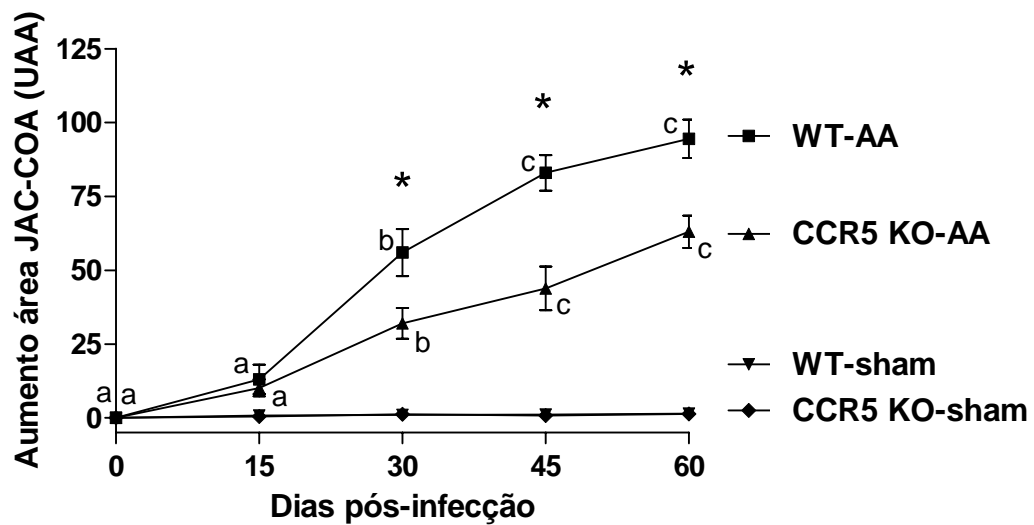
Com relação à reabsorção óssea, constatou-se que os animais CCR5-KO apresentaram uma significativa redução ( $P < 0,05$ ) na área entre a junção amelo-cementária (JAC) e a crista óssea alveolar (COA) aos 30, 45 e 60 dias pós-infecção, quando comparados aos animais WT. Animais *sham*-infectados e o controle negativo ( $T_0$ ) não apresentaram perda óssea no período estudado (Fig. 4).

Além disso, a avaliação da migração de células RANKL<sup>+</sup> nos animais CCR5-KO demonstrou uma tendência de diminuição do influxo para o tecido periodontal quando comparados com os animais WT, sendo estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) no décimo quinto dia (Fig. 5), reforçando a hipótese de que as células CCR5<sup>+</sup> são importantes moduladoras da reabsorção óssea alveolar através da produção de RANKL nos tecidos periodontais doentes.

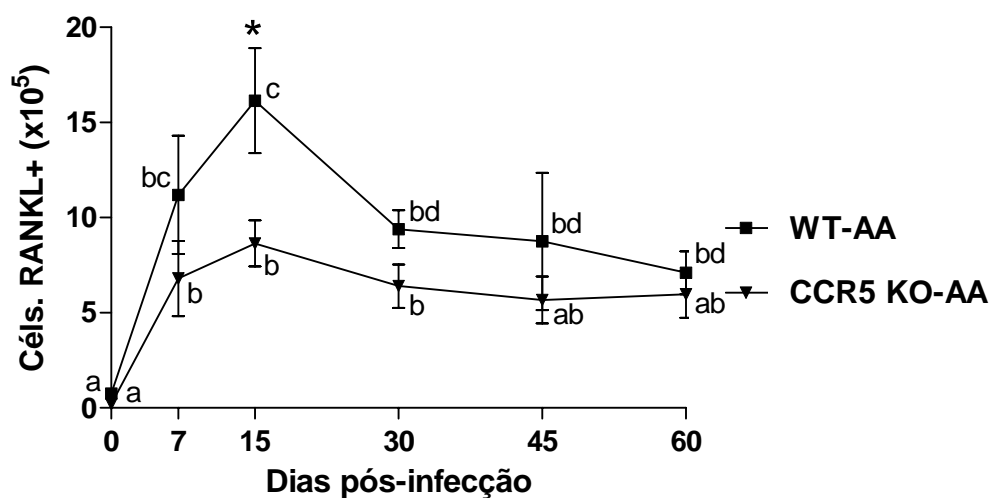
---



**Figura 3. Análise da migração do número total de células inflamatórias para os tecidos periodontais de camundongos C57BL/6 WT e CCR5-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*.** Células extraídas nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias após infecção com *A. actinomycetemcomitans* e analisadas através de citometria de fluxo. Os resultados representam os valores da média  $\pm$  SD. WT-AA = Animais C57BL/6 *wild type* infectados; CCR5 KO-AA = Animais C57BL/6 CCR5-*knockout* infectados; WT-*sham* = Animais C57BL/6 *wild type sham*-infectados; CCR5 KO-*sham* = Animais C57BL/6 CCR5-*knockout sham*-infectados. \*P<0,05; One-way ANOVA, WT-AA vs CCR5 KO-AA no mesmo tempo experimental. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os tempos dentro do mesmo grupo experimental (P<0,05; One-way ANOVA). Valores do tempo zero são considerados como os valores do controle negativo.



**Figura 4. Análise da perda óssea alveolar em camundongos C57BL/6 WT e CCR5-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*.** Aumento da área JAC-COA na face palatina dos molares, em relação aos animais controle, medida em unidades arbitrárias de área (UAA) com o programa ImageToll 2.0. Os resultados representam os valores da média  $\pm$  SD. WT-AA = Animais C57BL/6 *wild type* infectados; CCR5 KO-AA = Animais C57BL/6 CCR5-*knockout* infectados; WT-*sham* = Animais C57BL/6 *wild type sham*-infectados; CCR5 KO-*sham* = Animais C57BL/6 CCR5-*knockout sham*-infectados. \* $P < 0,05$ , One-way ANOVA, WT-AA vs WT-CCR5 KO-AA no mesmo tempo experimental. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os tempos dentro do mesmo grupo experimental ( $P < 0,05$ ; One-way ANOVA). Valores do tempo zero são considerados como os valores do controle negativo.



**Figura 5.** Análise cinética das células RANKL+ extraídas dos tecidos periodontais de camundongos C57BL/6 CCR5-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Células extraídas nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias após infecção com *A. actinomycetemcomitans* e analisadas através de citometria de fluxo. Os resultados representam os valores da média  $\pm$  SD. WT-AA = Animais C57BL/6 *wild type* infectados; CCR5 KO-AA = Animais C57BL/6 CCR5-*knockout* infectados. \* $P < 0,05$ ; One-way ANOVA, WT-AA vs CCR5 KO-AA no mesmo tempo experimental. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os tempos dentro do mesmo grupo experimental ( $P < 0,05$ ; One-way ANOVA). Valores do tempo zero são considerados como os valores do controle negativo.

---

#### 4.4 Papel de CCR5 na modulação da expressão de citocinas e quimiocinas nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*

Uma vez que a ausência do receptor CCR5 diminui a quantidade de células CCR5+ nos tecidos periodontais, podendo isto ter implicação direta sobre a patogênese das DP, investigou-se em seguida o papel de CCR5 na modulação da expressão de mRNA de determinadas citocinas como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , CXCL1 (KC - similar murina da IL-8 humana, quimioatraente para neutrófilos), CXCL2 (MIP-2 - quimioatraente para monócitos e neutrófilos) e IL-10 nos tecidos periodontais de camundongos CCR5-KO submetidos ao protocolo de indução de DP (Fig. 6 e 7). Os resultados demonstram que a expressão de TNF- $\alpha$  foi significativamente menor ( $P < 0,05$ ) nos dias 7, 15, 30 e 60 dias pós-infecção (Fig. 6). Do mesmo modo, a IL-1 $\beta$  se mostrava significativamente reduzida ( $P < 0,05$ ) aos 7, 15 e 60 dias pós-infecção nos animais CCR5-KO, enquanto no tempo de 30 dias pós-infecção, uma pequena redução na expressão de IL-1 $\beta$  foi constatada, porém sem diferença estatisticamente significativa (Fig. 6). Constatou-se também que a expressão de IFN- $\gamma$  se mostrava significativamente reduzida ( $P < 0,05$ ) nos animais CCR5-KO nos tempos de 7 e 15 dias pós-infecção (Fig. 6).

A expressão de CXCL1 apresentou-se aumentada nos animais CCR5-KO quando comparada à dos animais WT, principalmente nos dias 15 e 60, quando houve diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) (Fig. 7). Já a expressão de IL-10 nos animais CCR5-KO foi semelhante à dos animais WT, exceto no dia 60, quando houve diminuição significativa nos animais KO ( $P < 0,05$ ) (Fig. 7). Para a expressão de CXCL2 não foram encontradas diferenças significativas entre os animais CCR5-KO e WT (Fig. 7).

Os resultados de regressão linear demonstraram uma correlação positiva entre a presença e quantidade das células CCR5+ com a expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  ( $r^2 = 0,8612$ ;  $P < 0,05$ ), IL-1 $\beta$  ( $r^2 = 0,8979$ ;  $P < 0,05$ ) e IFN- $\gamma$  ( $r^2 = 0,9047$ ;  $P < 0,05$ ).

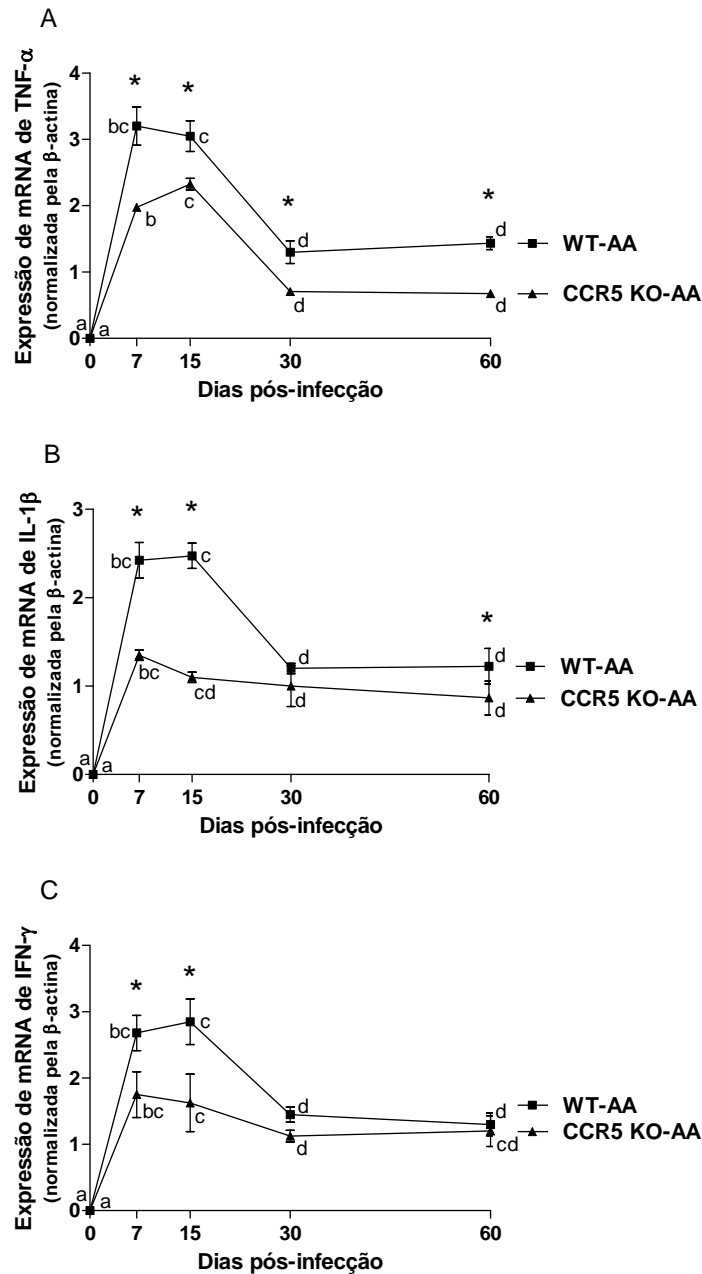
Os grupos controles (*sham*-infectados e  $T_0$ ) não exibiram expressão de mRNA de nenhuma destas citocinas nos tecidos periodontais (dados não mostrados).

---

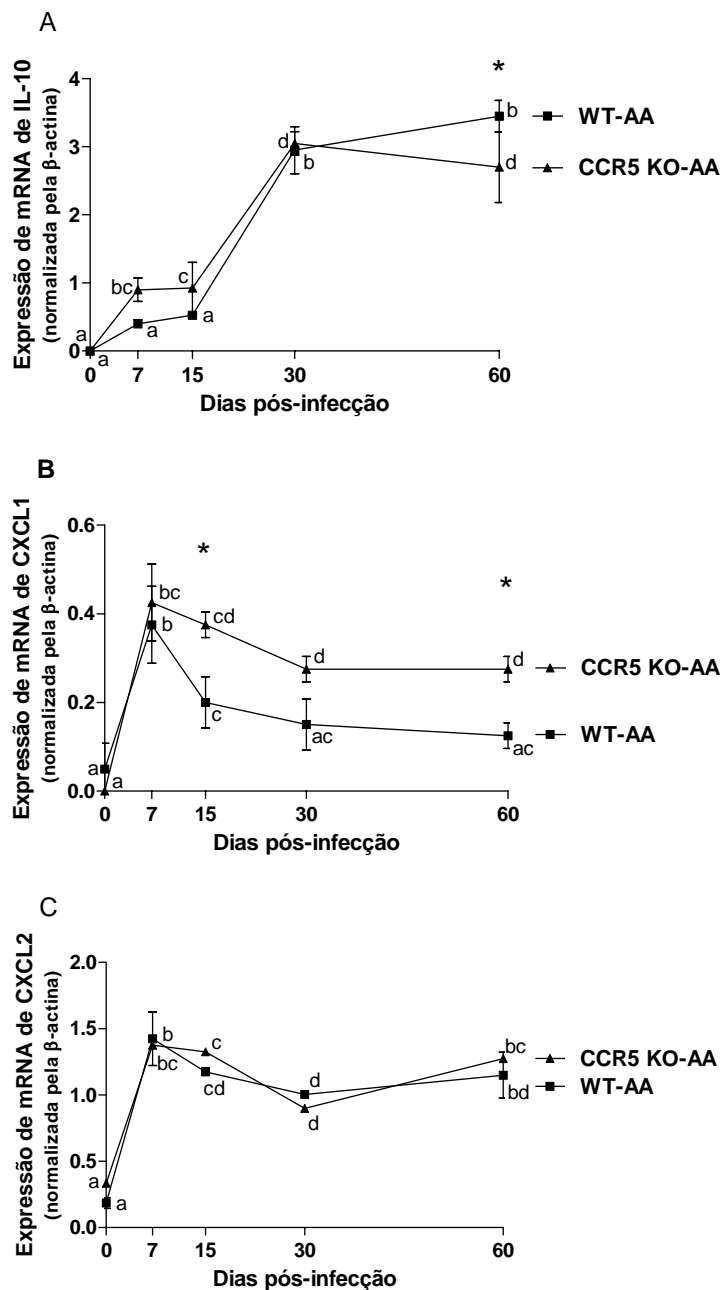
A expressão do gene constitutivo  $\beta$ -actina foi verificada em todos os tempos analisados (dados não mostrados), sendo utilizada como controle positivo da reação e para normalização dos níveis de expressão de mRNA.

---





**Figura 6.** Expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  em camundongos C57BL/6 WT e CCR5-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. O RNA total foi extraído e os níveis individuais de mRNA foram quantificados por RealTime-PCR com sistema SYBR-Green. O resultado apresentado representa o valor da média  $\pm$  SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da  $\beta$ -actina. WT-AA = Animais C57BL/6 *wild type* infectados; CCR5 KO-AA = Animais C57BL/6 CCR5-*knockout* infectados. \* $P < 0,05$ , One-way ANOVA, WT-AA vs WT-CCR5 KO-AA no mesmo tempo experimental. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os tempos dentro do mesmo grupo experimental ( $P < 0,05$ ; One-way ANOVA). Valores do tempo zero são considerados como os valores do controle negativo.



**Figura 7.** Expressão de IL-10, CXCL1 (KC) e CXCL2 (MIP-2) em camundongos C57BL/6 WT e CCR5-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. O RNA total foi extraído e os níveis individuais de mRNA foram quantificados por RealTime-PCR com sistema SYBR-Green. O resultado apresentado representa o valor da média  $\pm$  SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da  $\beta$ -actina. WT-AA = Animais C57BL/6 *wild type* infectados; CCR5 KO-AA = Animais C57BL/6 *CCR5-knockout* infectados. \* $P < 0,05$ , One-way ANOVA, WT-AA vs WT-CCR5 KO-AA no mesmo tempo experimental. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os tempos dentro do mesmo grupo experimental ( $P < 0,05$ ; One-way ANOVA). Valores do tempo zero são considerados como os valores do controle negativo.

#### **4.5 Papel de CCR5 na modulação da expressão MMPs, RANKL e seus respectivos inibidores, TIMPs e OPG, nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans***

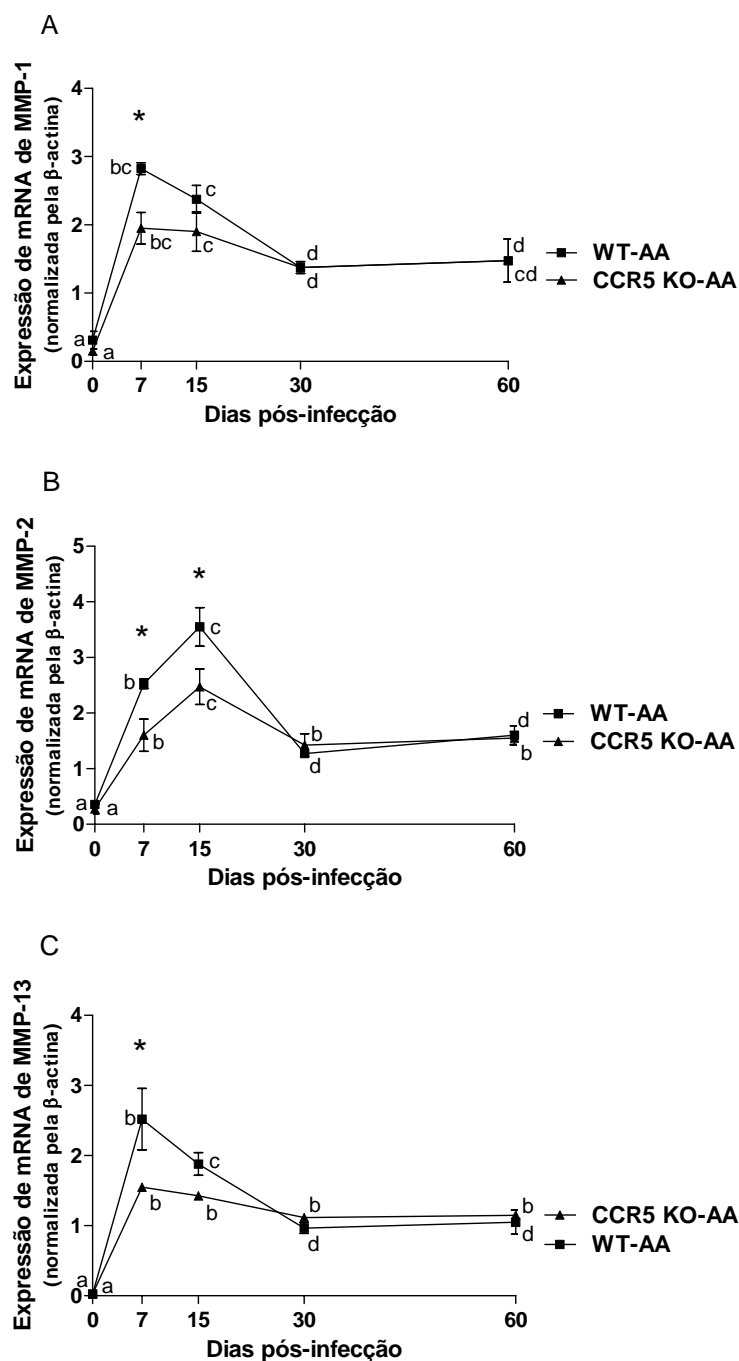
O próximo passo foi analisar a influência do receptor CCR5 sobre os níveis de expressão de mRNA de MMPs, RANKL e seus respectivos inibidores durante o curso da DP experimental. Os resultados demonstram uma diminuição estatisticamente significativa da expressão de MMP-1 (no tempo de 7 dias,  $p < 0,05$  vs WT), MMP-2 (nos tempos de 7 e 15 dias,  $p < 0,05$  vs WT), e MMP-13 (no tempo 7 dias,  $p < 0,05$  vs WT) nos animais CCR5-KO quando comparada à expressão vista nos animais WT (Fig. 8). A análise de regressão linear demonstrou correlação positiva entre as células CCR5+ e a expressão de MMP-1 ( $r^2 = 0,7728$ ;  $P < 0,05$ ) e MMP-2 ( $r^2 = 0,9867$ ;  $P < 0,05$ ).

Ao analisar-se a expressão de TIMPs, verificou-se que nos animais CCR5-KO a expressão de TIMP-1 se mostrava semelhante à dos animais WT, sendo significativamente menor somente no tempo de 60 dias ( $P < 0,05$ ) pós-infecção (Fig. 9). Com relação à expressão de TIMP-3, os resultados demonstram uma expressão similar entre os animais CCR5-KO e WT nos tempos de 7 e 30 dias pós-infecção, enquanto que aos 15 dias houve um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) nos animais CCR5-KO (Fig. 9) e aos 60 dias houve diminuição ( $P < 0,05$ ).

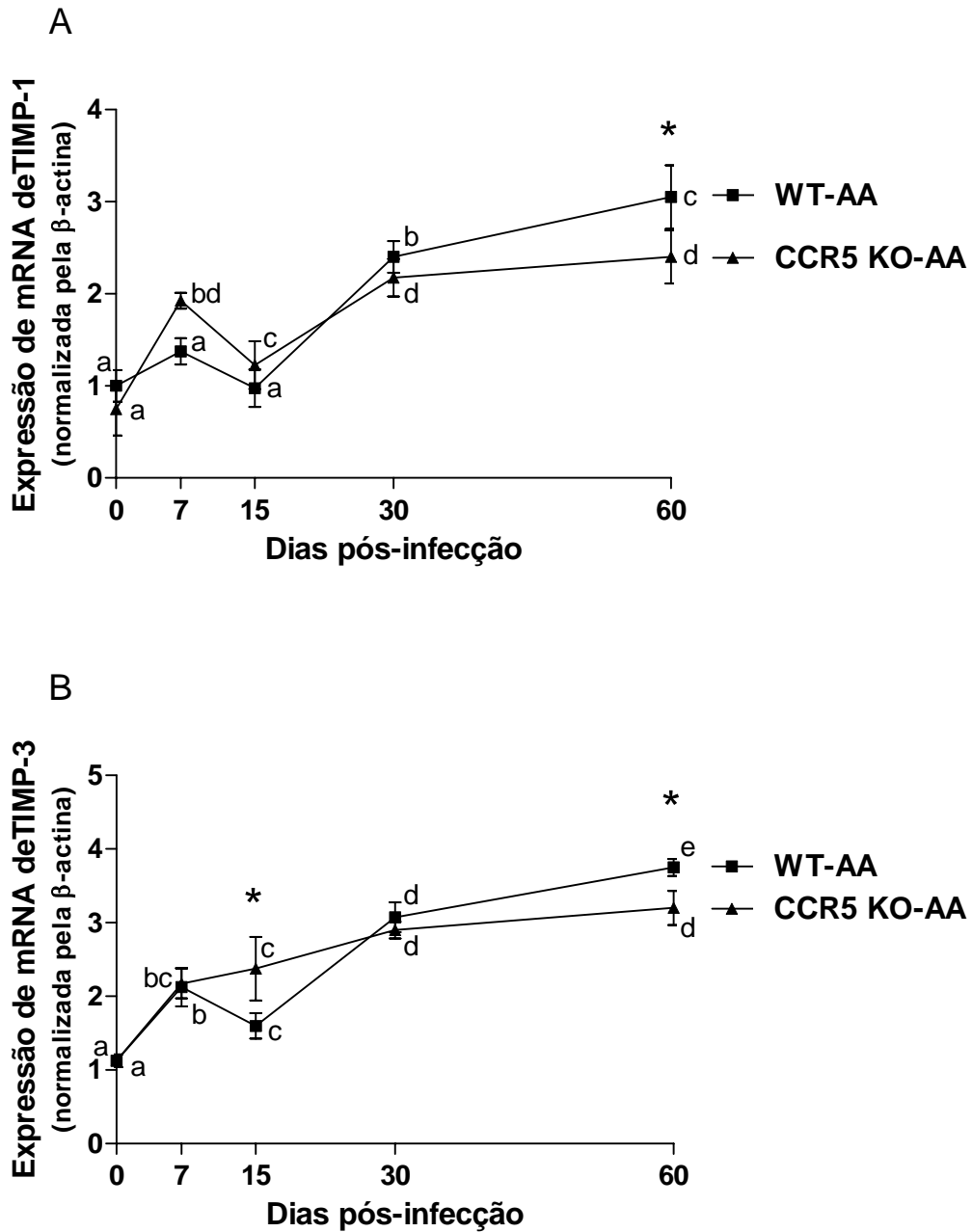
Os grupos controles (*sham*-infectados e  $T_0$ ) não exibiram expressão de mRNA de nenhum destes fatores nos tecidos periodontais (dados não mostrados).

A expressão do gene constitutivo  $\beta$ -actina foi verificada em todos os tempos analisados (dados não mostrados), sendo utilizada como controle positivo da reação e para normalização dos níveis de expressão de mRNA.

---



**Figura 8.** Expressão de MMP-1, MMP-2 e MMP-13 em camundongos C57BL/6 WT e CCR5-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. O RNA total foi extraído e os níveis individuais de mRNA foram quantificados por RealTime-PCR com sistema SYBR-Green. O resultado apresentado representa o valor da média  $\pm$  SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da  $\beta$ -actina. WT-AA = Animais C57BL/6 *wild type* infectados; CCR5 KO-AA = Animais C57BL/6 CCR5-*knockout* infectados. \* $P < 0,05$ , One-way ANOVA, WT-AA vs WT-CCR5 KO-AA no mesmo tempo experimental. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os tempos dentro do mesmo grupo experimental ( $P < 0,05$ ; One-way ANOVA). Valores do tempo zero são considerados como os valores do controle negativo.



**Figura 9.** Expressão de TIMP-1 e TIMP-3 em camundongos C57BL/6 WT e CCR5-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. O RNA total foi extraído e os níveis individuais de mRNA foram quantificados por RealTime-PCR com sistema SYBR-Green. O resultado apresentado representa o valor da média  $\pm$  SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da  $\beta$ -actina. WT-AA = Animais C57BL/6 *wild type* infectados; CCR5 KO-AA = Animais C57BL/6 CCR5-*knockout* infectados. \* $P < 0,05$ , One-way ANOVA, WT-AA vs WT-CCR5 KO-AA no mesmo tempo experimental. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os tempos dentro do mesmo grupo experimental ( $P < 0,05$ ; One-way ANOVA). Valores do tempo zero são considerados como os valores do controle negativo.

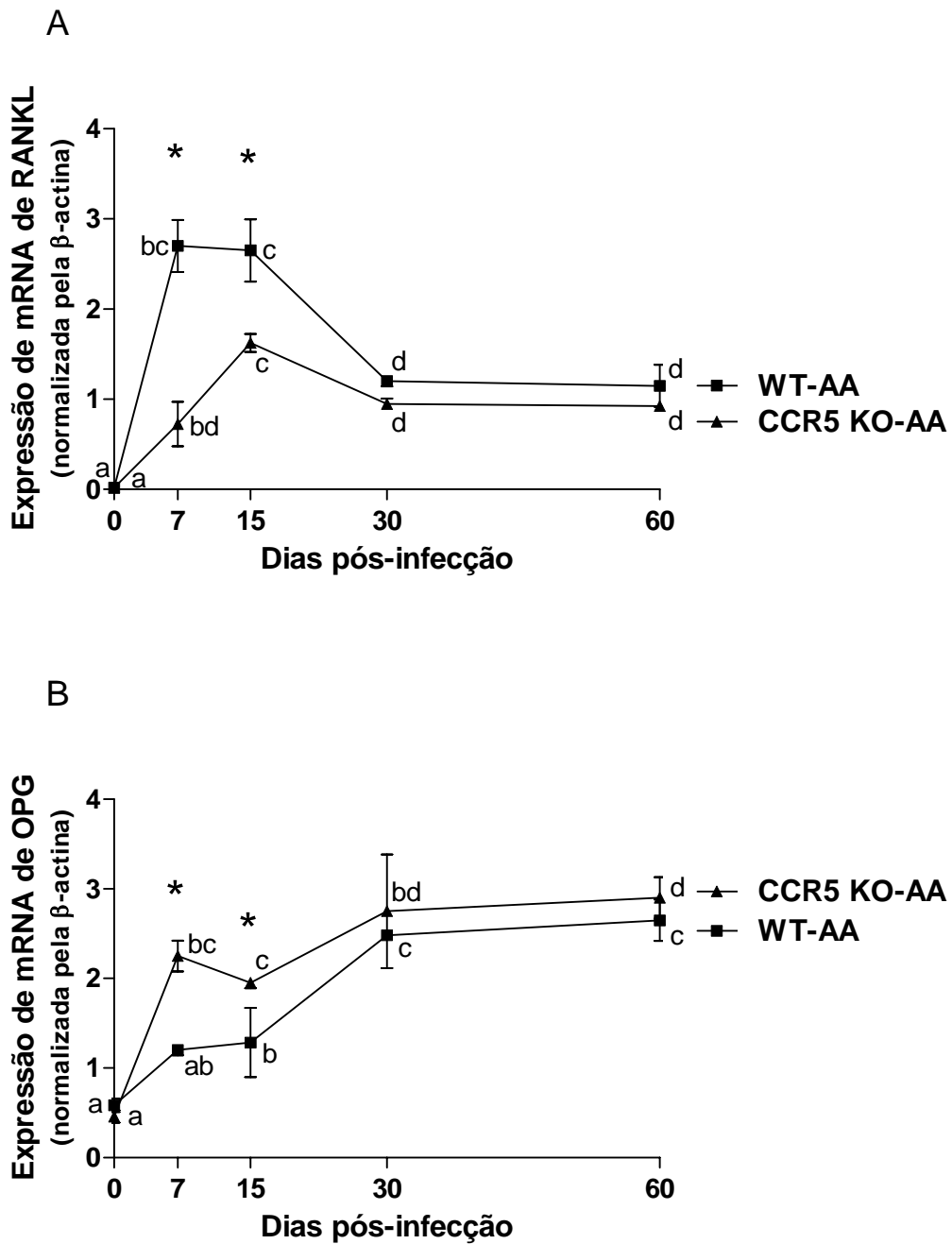
Os presentes dados também demonstram uma redução significativa na expressão de RANKL nos animais CCR5-KO comparados aos camundongos WT infectados, aos 7 ( $p < 0,05$  vs WT) e 15 ( $p < 0,05$  vs WT) dias pós-infecção (Fig. 10). Este resultado foi confirmado através da medição por ELISA no tempo de 30 dias pós-infecção que também demonstrou diminuição significativa da produção de RANKL (Fig. 11A). Ao comparar-se os níveis de expressão de OPG nos animais CCR5-KO e WT infectados com *A. actinomycetemcomitans*, os resultados demonstram uma expressão significativamente aumentada de tal fator nos animais CCR5-KO nos tempos de 7 e 15 dias pós-infecção ( $P < 0,05$  vs WT), enquanto que nos demais tempos analisados não foram encontradas diferenças significativas (Fig. 10). A avaliação por ELISA no tempo de 30 dias pós-infecção mostrou um aumento na produção de OPG, porém sem diferença estatisticamente significativa (Fig. 11B).

Os resultados de regressão linear demonstraram uma correlação positiva entre a presença e quantidade das células CCR5+ com a expressão de mRNA de RANKL ( $r^2 = 0,8677$ ;  $P < 0,05$ ), MMP-1 ( $r^2 = 0,7728$ ;  $P < 0,05$ ) e MMP-2 ( $r^2 = 0,9867$ ;  $P < 0,05$ ).

Os grupos controles (*sham*-infectados e  $T_0$ ) não exibiram expressão de mRNA de nenhum destes fatores nos tecidos periodontais (dados não mostrados).

A expressão do gene constitutivo  $\beta$ -actina foi verificada em todos os tempos analisados (dados não mostrados), sendo utilizada como controle positivo da reação e para normalização dos níveis de expressão de mRNA.

---



**Figura 10.** Expressão de RANKL e OPG em camundongos C57BL/6 WT e CCR5-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. O RNA total foi extraído e os níveis individuais de mRNA foram quantificados por RealTime-PCR com sistema SYBR-Green. O resultado apresentado representa o valor da média  $\pm$  SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da  $\beta$ -actina. WT-AA = Animais C57BL/6 *wild type* infectados; CCR5 KO-AA = Animais C57BL/6 CCR5-*knockout* infectados. \* $P < 0,05$ , One-way ANOVA, WT-AA vs WT-CCR5 KO-AA no mesmo tempo experimental. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os tempos dentro do mesmo grupo experimental ( $P < 0,05$ ; One-way ANOVA). Valores do tempo zero são considerados como os valores do controle negativo.

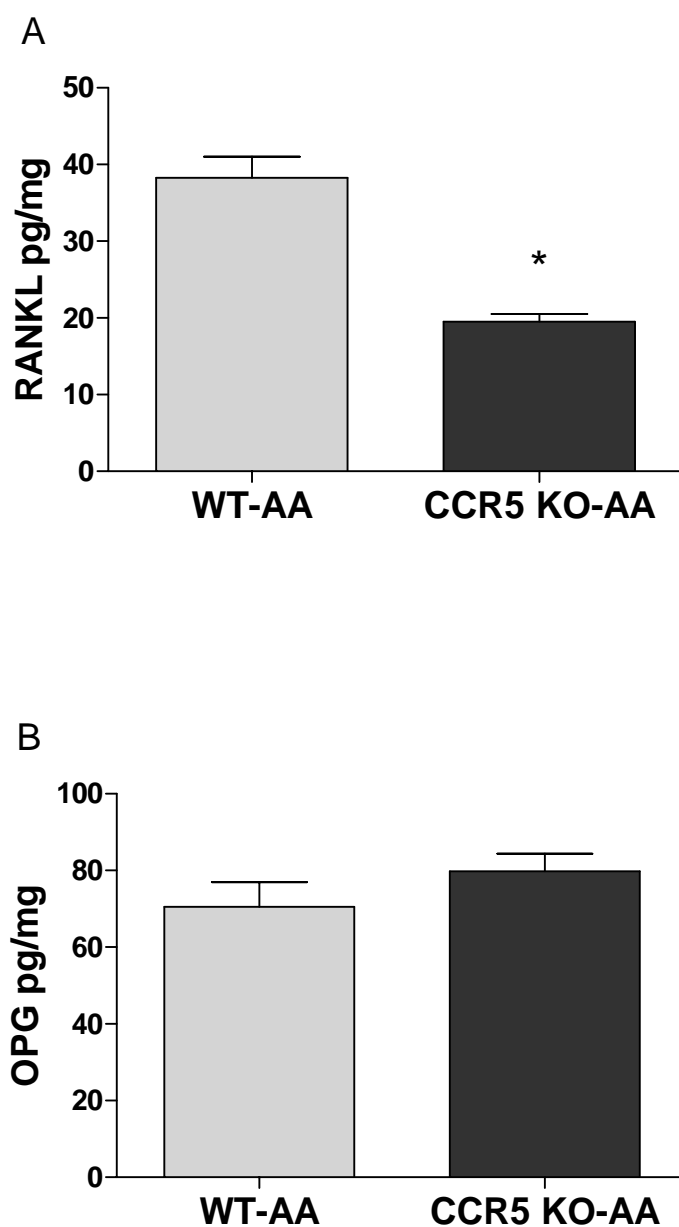


Figura 11. Produção de RANKL e OPG em camundongos C57BL/6 WT e CCR5-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Os níveis individuais das citocinas foram quantificados por ELISA. Valores médios  $\pm$  SD referentes ao tempo de 30 dias pós-infecção. WT-AA = Animais C57BL/6 *wild type* infectados; CCR5 KO-AA = Animais C57BL/6 CCR5-*knockout* infectados. \* $P < 0,05$  vs WT; teste t de Student.



#### **4.6 Papel do CCR5 na modulação da infecção experimental por *A. actinomycetemcomitans***

Para avaliar o papel do CCR5 sobre o controle da infecção bacteriana foi verificada sua influência sobre a produção de fatores antimicrobianos como a MPO e iNOS assim como a carga de DNA bacteriano presente no tecido periodontal.

Os níveis de MPO se mostraram aumentados nos animais CCR5-KO no tempo de 60 dias ( $P < 0,05$ ) não havendo diferença nos outros tempos experimentais (Fig. 12A). Por outro lado, a expressão de mRNA de iNOS mostrou-se significativamente diminuída nos tempos de 15 e 60 dias ( $P < 0,05$ ) pós-infecção, sem diferença nos outros tempos (Fig. 12B).

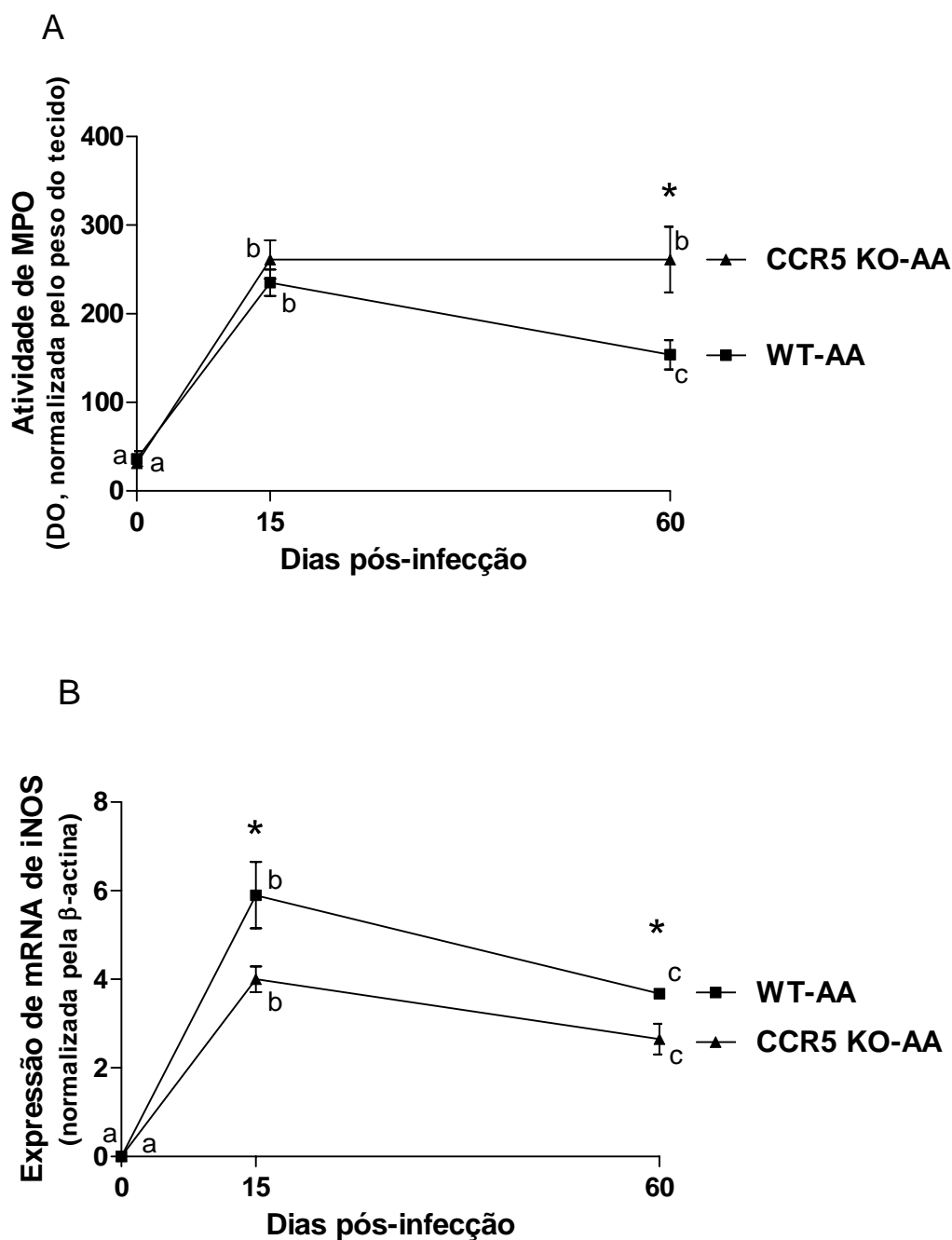
Os grupos controles (*sham*-infectados e  $T_0$ ) não exibiram atividade ou expressão de mRNA de nenhum destes fatores nos tecidos periodontais (dados não mostrados).

A expressão do gene constitutivo beta-actina foi verificada em todos os tempos analisados (dados não mostrados), sendo utilizada como controle positivo da reação e para normalização dos níveis de expressão de mRNA.

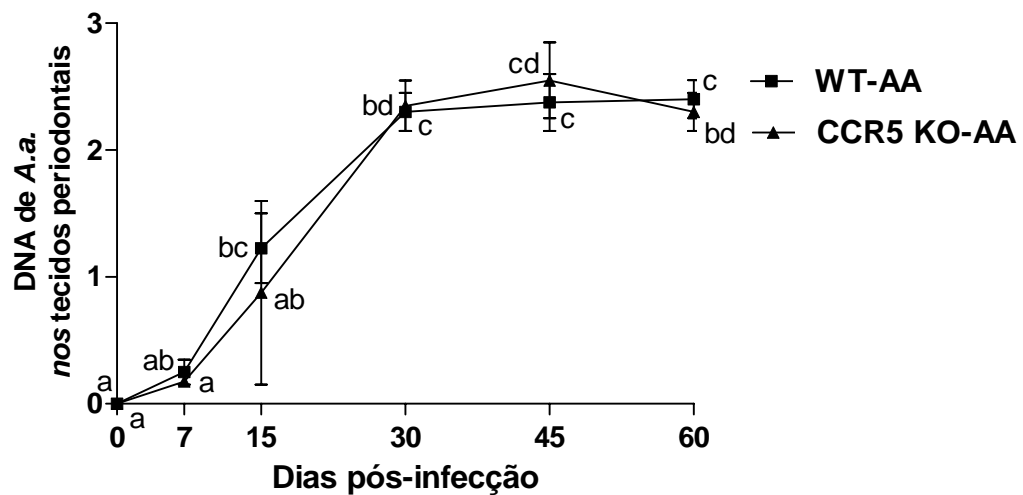
O próximo passo foi a análise da resistência de camundongos CCR5-KO à infecção por *A. actinomycetemcomitans*. Os dados demonstram que, apesar da redução na expressão de iNOS, a detecção de DNA de *A. actinomycetemcomitans* nos tecidos periodontais dos animais CCR5-KO não apresentou diferença significativa quando comparada à dos animais WT em nenhum dos tempos experimentais pós-infecção (Fig. 13).

Não foram verificadas alterações no ganho de peso apresentado pelos animais CCR5-KO infectados, durante o período analisado (dados não mostrados). Também não foi constatada mortalidade de animais CCR5-KO ou WT, infectados ou *sham*-infectados até 60 dias após a infecção (dados não mostrados).

---



**Figura 12. Níveis de MPO e iNOS mRNA em camundongos C57BL/6 WT e CCR5-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*.** Camundongos CCR5-KO e C57BL/6 (WT) submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A. actinomycetemcomitans* foram analisados quanto ao nível de MPO (média  $\pm$  SD da DO referente à atividade de MPO nos tecidos periodontais por animal, normalizados pelo peso do tecido, pool de 5 animais em cada tempo) e iNOS mRNA (RNA total foi extraído e os níveis individuais de mRNA foram quantificados por RealTime-PCR com sistema SYBR-Green. O resultado apresentado representa o valor da média  $\pm$  SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da  $\beta$ -actina). WT-AA = Animais C57BL/6 *wild type* infectados; CCR5 KO-AA = Animais C57BL/6 *CCR5-knockout* infectados. \* $P < 0,05$ , One-way ANOVA, WT-AA vs WT-CCR5 KO-AA no mesmo tempo experimental. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os tempos dentro do mesmo grupo experimental ( $P < 0,05$ ; One-way ANOVA). Valores do tempo zero são considerados como os valores do controle negativo.



**Figura 13. Papel das células CCR5+ no controle da infecção periodontal por *A. actinomycetemcomitans* em camundongos C57BL/6 WT e CCR5-KO.** A carga bacteriana (*A. actinomycetemcomitans*) nos tecidos periodontais de animais WT e CCR5-KO durante o curso da doença foi analisada através de RealTime-PCR com sistema SYBR-Green. O resultado apresentado representa o valor da média  $\pm$  SD dos níveis de DNA bacteriano, normalizado pelo peso do fragmento de tecido periodontal utilizado para extração do DNA. WT-AA = Animais C57BL/6 *wild type* infectados; CCR5 KO-AA = Animais C57BL/6 *CCR5-knockout* infectados. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os tempos dentro do mesmo grupo experimental ( $P < 0,05$ ; One-way ANOVA). Valores do tempo zero são considerados como os valores do controle negativo.







# *Discussão*









## 5 DISCUSSÃO

As doenças periodontais são alterações crônicas inflamatórias dos tecidos de suporte dos órgãos dentais. Além dos danos aos tecidos periodontais, diversos estudos têm demonstrado que tais doenças podem atuar como modificadoras da saúde sistêmica dos pacientes, predispondo a ocorrência ou agravamento de diversos estados patológicos (LOESCHE, 1993; 1996; PAGE, 1998; 1999; EBERSOLE e CAPPELLI, 2000; FOWLER, BREault e CUENIN, 2001; KINANE e LAPPIN, 2001).

A etiologia das DP é dependente da presença de bactérias periodontopatogênicas, porém, apesar da presença de micro-organismos ser fundamental para o início do desenvolvimento da doença, a amplificação e progressão deste processo são altamente dependentes da resposta inflamatória e imunológica gerada pelo hospedeiro em resposta às bactérias ou a seus produtos. Sabe-se que a resposta imune responsável pela proteção do hospedeiro contra a infecção é a mesma que causa danos aos tecidos periodontais. Acredita-se que esta resposta depende de vários fatores como os genéticos, a natureza e intensidade do estímulo antigênico, a interação das células apresentadoras de antígeno com os receptores de superfície das células de defesa, e as citocinas e quimiocinas produzidas no microambiente periodontal.

As células da resposta imune inata são as primeiras células de defesa a entrarem em contato com os antígenos, sendo responsáveis pela apresentação destes antígenos e pela produção de citocinas e quimiocinas responsáveis pela instalação da resposta imune adaptativa através da diferenciação e atração das células Th para o local da infecção (GEMMELL e SEYMOUR, 2004). Esta atração depende do tipo de quimiocinas produzidas no local e dos tipos de receptores de quimiocina expressos na superfície celular dos linfócitos (GARLET et al., 2003; GARLET et al., 2006). Assim, esta interação entre citocinas e quimiocinas produzidas no local de infecção e os receptores expressos pelos linfócitos determinará o tipo de célula Th que migrará para os tecidos periodontais infectados e, através

---

---

do balanço entre as respostas imunológicas do tipo Th1 ou Th2, conseqüentemente, o curso do desenvolvimento das lesões periodontais (GEMMELL e SEYMOUR, 2004).

Muitos estudos têm sido conduzidos na intenção de compreender o papel das células Th na doença periodontal. Alguns estudos consideram as células Th1 como responsáveis pela destruição dos tecidos periodontais enquanto outros atribuem esta ação às células Th2 (TAUBMAN e KAWAI, 2001; HOURI-HADDAD, WILENSKY e SHAPIRA, 2007). Ainda, outros estudos não consideram que as células Th1 possam ser responsáveis pela destruição, principalmente do osso alveolar, por acreditarem que a citocina prototípica destas células, o IFN- $\gamma$ , bloqueia o processo de osteoclastogênese através da interrupção da cascata de sinalização intracelular via TRAF6 (TAKAYANAGI et al., 2005; TAKAYANAGI, 2007).

Estudos anteriores realizados em humanos com doença periodontal e em camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans* demonstraram a presença de diversas quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10 e receptores de quimiocinas como CCR4, CCR8 e CXCR3 expressos em altos níveis nos tecidos periodontais doentes (GARLET et al., 2003; GARLET et al., 2005). Entre estes fatores está o receptor CCR5, que em condições de saúde periodontal tem expressão mínima ou mesmo inexistente (TONETTI et al., 1994; GAMONAL et al., 2001; GEMMELL, CARTER e SEYMOUR, 2001; GARLET et al., 2003), porém seu exato papel na modulação da reação inflamatória e destruição tecidual não é conhecido.

As quimiocinas CCL3, CCL4 e CCL5 se ligam ao receptor CCR5 (RAPORT et al., 1996), sendo desta forma as responsáveis pela quimioatração das células de defesa que expressam este receptor, podendo influenciar no desenvolvimento da DP. Pelo fato de estudos prévios em animais e humanos (GARLET et al., 2003; GARLET et al., 2005) demonstrarem que há expressão destas quimiocinas e seu receptor durante o curso da doença periodontal, torna-se importante entender a participação das células que expressam o receptor CCR5 neste processo patológico.

Assim, tendo como objetivo investigar a participação das células que expressam o receptor CCR5 (CCR5+) na modulação da severidade da doença periodontal, foi analisado inicialmente o fenótipo destas células presentes nos tecidos periodontais de animais WT com doença periodontal experimentalmente induzida através de infecção por *A. actinomycetemcomitans*.

---

---

Desta forma, verificou-se através de citometria de fluxo, que no trigésimo dia pós-infecção, grande parte das células que expressavam o receptor CCR5 co-expressavam os marcadores de superfície CD3 e o receptor CXCR3 (Fig. 1A), o que caracteriza um fenótipo compatível com linfócitos *T-helper* do subtipo Th1 (QIN et al., 1998). Este resultado está de acordo com estudos prévios que demonstraram a prevalência de citocinas características de células Th1 no período de 30 dias após a indução da doença periodontal (GARLET et al., 2005; GARLET et al., 2006).

De fato, outros estudos têm reportado uma predominância de resposta imune do tipo Th1 na doença periodontal em sua fase destrutiva (EBERSOLE e TAUBMAN, 1994; SALVI et al., 1998; TAUBMAN e KAWAI, 2001). A presença de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  nos sítios doentes, caracterizando este padrão de resposta, têm sido descrita (SALVI et al., 1998; GARLET et al., 2005; GARLET et al., 2006), porém o exato papel das células Th1 nas doenças periodontais ainda não está totalmente revelado.

Na DP as células Th ativadas participam do processo de destruição do periodonto tanto modulando o processo de degradação dos tecidos moles quanto da reabsorção óssea alveolar. A modulação da destruição óssea alveolar ocorre de duas formas: indiretamente, através da liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , que estimularão outras células, principalmente os osteoblastos, a produzir RANKL ou diretamente, produzindo elas próprias o RANKL, estimulando assim a osteoclastogênese (TAKAYANAGI, 2005; GARLET et al., 2006).

Assim sendo, o envolvimento das células CCR5+ na modulação da destruição óssea foi investigado avaliando-se a compatibilidade do fenótipo das células que expressavam RANKL encontradas nos tecidos periodontais com o das células CCR5+ também presentes nos tecidos periodontais doentes. De fato, foi constatado que as células RANKL+ co-expressavam o marcador de superfície CD3, e os receptores CCR5 e CXCR3 (Fig. 1B). Em concordância com este resultado, a análise da migração das células positivas para CCR5 e para RANKL para os tecidos periodontais doentes, realizada através de citometria de fluxo, revelou uma cinética paralela (Fig. 2), confirmada pelo teste de regressão linear ( $r^2 = 0,8949$ ;  $P < 0,05$ ). Assim, estes resultados sugerem que as células CCR5 (Th1) são responsáveis por intensa expressão de RANKL nos tecidos periodontais doentes.

Uma vez determinado o fenótipo Th1 para a maioria das células RANKL+ na periodontite experimental, e tendo em vista as evidências anteriormente consideradas da possível participação do receptor CCR5 na patogênese da doença, o passo seguinte foi

---

---

analisar a influência de tal receptor no processo inflamatório e destrutivo na doença periodontal através da utilização de animais geneticamente modificados (CCR5-KO).

Desta forma, verificou-se que a ausência do receptor CCR5 resulta em diminuição da migração das células inflamatórias totais para o tecido periodontal no decorrer dos tempos experimentais (Fig. 3). De fato, de uma forma geral, a migração de células inflamatórias tem se mostrado diretamente ligada com a progressão da doença (ASSUMA et al., 1998; GRAVES et al., 1998; GAMONAL et al., 2001). Sendo assim, a diminuição na quantidade de células inflamatórias no sítio da doença, causada pela ausência do receptor CCR5, gera consequentemente, menor produção de citocinas inflamatórias, caracteristicamente associadas à destruição periodontal (GRAVES, 2008), atenuando assim a severidade da doença.

Além disso, esta diminuição do número total de células mostrou-se não ser totalmente inespecífica, uma vez que o número de células RANKL+ sofreu diminuição (Fig. 5), demonstrando que o receptor CCR5 está realmente correlacionado com células que expressam RANKL, naturalmente envolvidas no processo de destruição óssea alveolar. Além disso, tendo sido determinado o fenótipo das células CCR5+ como principalmente células do subtipo Th1, pode-se concluir que a diminuição do número total de células inflamatórias é dada principalmente pela diminuição da parcela de células Th1 e secundariamente por outros poucos tipos celulares que também expressam CCR5 (Fig. 1).

O elevado número de células RANKL+CD3+CCR5+CXCR3+ nos animais WT no décimo quinto dia pós-infecção (Fig. 2) é coincidente com o início da fase crescente de reabsorção óssea (Fig. 4), sugerindo que as células Th1, apesar da produção prototípica de IFN- $\gamma$  (BROMBACHER, KASTELEIN e ALBER, 2003; SZABO et al., 2003), desempenham um papel importante na destruição óssea alveolar na doença periodontal através da ativação de osteoclastos pelo eixo RANK-RANKL. Este fato pode ser confirmado pela redução significativa da destruição óssea alveolar detectada nos camundongos CCR5-KO (Fig. 4). Esta menor destruição óssea alveolar é devida à deficiência do receptor CCR5, que resulta numa diminuição da quimioatração das células Th1 RANKL+ para os sítios de atividade da doença periodontal (Fig. 5). Concordando com tal hipótese, os animais CCR5-KO exibiram expressão significativamente menor dos níveis de mRNA de RANKL nos dias 7 e 15 pós-infecção, quando estes níveis alcançam seu valor máximo nos animais WT (Fig. 10A).

Além da diminuição da migração de células RANKL+, a diminuição da reabsorção óssea também pode ser devida à diminuição do número total de células inflamatórias e consequentemente diminuição na quantidade de citocinas pró-inflamatórias no local, o que

---

---

causaria menor estímulo às células residentes, como os fibroblastos, que estimulados, poderiam também expressar RANKL contribuindo para o processo de destruição óssea (TAKAYANAGI, 2005, 2007).

Com relação às citocinas, estas apresentam um papel importante na patogênese da doença periodontal, pois as mesmas não só modulam indiretamente a reabsorção óssea, através do estímulo da expressão de RANKL como já citado anteriormente, ou mesmo o balanço RANKL/OPG, como também modulam o balanço entre a produção das MMPs e TIMPs (GARLET et al., 2006). De fato, verificou-se que a presença de células CCR5+ estava correlacionada com a expressão de mRNA das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Fig. 6). Os animais CCR5-KO apresentaram níveis significativamente menores da expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  em todos os tempos experimentais (Fig. 6A). Para os níveis de IL-1 $\beta$ , houve redução significativa nos dias 7, 15 e 60 (Fig. B), enquanto que o IFN- $\gamma$  demonstrou redução nos dias 7 e 15, justamente quando os níveis atingem seu pico mais alto nos animais WT (Fig. 6C). A análise de regressão linear demonstrou uma relação positiva entre a presença das células CCR5+ e os níveis de TNF- $\alpha$  ( $r^2= 0,8612$ ;  $P<0,05$ ), IL-1 $\beta$  ( $r^2= 0,8979$ ;  $P<0,05$ ) e IFN- $\gamma$  ( $r^2= 0,9047$ ;  $P<0,05$ ). Isto demonstra que a presença das células CCR5+ exerce papel fundamental na modulação dos níveis destas citocinas, exercendo assim papel importante na modulação da severidade da doença periodontal. Já para os níveis de IL-10, as células CCR5 demonstraram não ter influência significativa sobre sua modulação, visto que os níveis de expressão nos animais CCR5-KO são semelhantes aos níveis dos animais WT (Fig. 7A).

Sendo assim, animais CCR5-KO exibem menor expressão de citocinas inflamatórias, resultando em menor severidade da doença periodontal experimentalmente induzida. Esta diminuição da severidade pode ser explicada pela interferência no balanço entre RANKL/OPG e MMPs/TIMPs como discutido a seguir.

No caso da reabsorção óssea, como já citada, a diminuição da quimioatração das células Th1 que expressam RANKL ou citocinas que estimulam a expressão de RANKL, causada pela ausência do receptor CCR5, levaria a uma menor quantidade de RANKL nos sítios doentes. Além disso, como demonstram os resultados, os níveis de OPG, o regulador natural da atividade do RANKL, não foram alterados pela ausência das células CCR5+ (Fig. 10B), o que demonstra que estas células não exercem influência direta ou indireta neste sentido. Desta forma, a diminuição dos níveis de RANKL aliada à expressão normal de OPG levaria a um menor grau de destruição óssea.

---

---

Em relação ao processo de destruição dos tecidos moles periodontais, o balanço entre a produção de MMPs, enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular, e TIMPs, seus inibidores naturais, é de suma importância e este balanço é influenciado pela presença de células inflamatórias e pela expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias (GARLET et al., 2004).

Neste caso, células Th1 ativadas expressando citocinas, como discutido anteriormente, atuam sobre o balanço dos níveis de MMPs e TIMPs, gerando assim degradação da matriz extracelular do tecido conjuntivo periodontal. Além do efeito sobre os tecidos moles, MMPs podem estar especialmente envolvidas na patogênese das doenças periodontais por também atuarem sobre a degradação óssea. A MMP-2 está envolvida tanto na degradação de tecidos moles como degradação óssea, enquanto a MMP-13 age especificamente na degradação óssea (ANDERSEN et al., 2004; HANNAS et al., 2007).

Os resultados da expressão de mRNA de MMP-1, MMP-2 e MMP-13 demonstraram que nos animais WT infectados, o pico de expressão ocorria aos 7 e 15 dias pós-infecção, quando então caíam para níveis menores aos 30 e 60 dias. Nos animais CCR5-KO houve redução na expressão destes fatores no período de 7 e 15 dias, demonstrando que a diminuição da presença das células CCR5+ causa diminuição da expressão das MMPs justamente no período em que apresentam seus maiores níveis nos animais WT (Fig. 8). Por outro lado, os TIMPs (TIMP-1 e -3) demonstraram não ser consideravelmente influenciados uma vez que seus níveis de expressão nos animais CCR5-KO nos tempos experimentais foram semelhantes ao dos animais WT, demonstrando que o controle da expressão dos TIMPs não é exercido pelas células Th1 (Fig. 9).

Desta forma, pode-se concluir, baseado no fato de que a diminuição de citocinas pró-inflamatórias e de MMPs está associada à menor degradação dos tecidos moles periodontais (AIBA et al., 1996; GARLET et al., 2006), que a diminuição das células CCR5+ nos tecidos periodontais vista neste estudo, levando a uma diminuição das citocinas pró-inflamatórias, resultando em menores níveis de expressão de MMPs, aliada à não alteração da expressão de TIMPs, geraria um efeito protetor dos tecidos moles periodontais.

Outro aspecto analisado foram os níveis das quimiocinas CXCL1 (KC) e CXCL2 (MIP-2), que poderiam exercer influência sobre a migração de células inflamatórias, uma vez que CXCL1 é um quimioatraente para neutrófilos e CXCL2 para monócitos e neutrófilos. A CXCL2 não se mostrou influenciada pelas células CCR5+ visto que não houve diferenças significativas de sua expressão nos animais CCR5-KO e WT. Já sobre a CXCL1, as células

---



---

CCR5<sup>+</sup> parecem exercer uma regulação negativa, uma vez que em todos os tempos experimentais, este apresentou tendência a níveis mais elevados nos animais CCR5-KO, tendo alcançado diferenças significativas nos dias 15 e 60 pós-infecção. Este último fato poderia ser uma das formas de regulação da transição entre imunidade inata e adquirida, uma vez que na presença de células CCR5<sup>+</sup> os níveis de CXCL1 diminuiriam, conseqüentemente diminuindo a migração de neutrófilos para o sítio de infecção.

Estudos relatam evidências de que a ação das quimiocinas através da ligação aos seus receptores vai além da quimioatração, baseados principalmente na elevada expressão de quimiocinas em condições patológicas associadas à infiltração de leucócitos (BAGGIOLINI, 2001; SZEKANECZ, KIM e KOCH, 2003). Na artrite reumatóide a expressão de CXCL12, quimiocina que se liga ao receptor CXCR4, está altamente expressa, modulando a atividade dos osteoclastos aumentando a reabsorção óssea e associada a aumento na expressão da MMP-9 (GRASSI et al., 2004). No mieloma múltiplo o estímulo via CCR5 em células do estroma pelas quimiocinas CCL4 e CCL5 induz à expressão de RANKL, estimulando a diferenciação de osteoclastos (ABE et al., 2002; MENU et al., 2006). Essas evidências conduzem à possibilidade de que o estímulo gerado pela ligação de quimiocinas ao receptor CCR5, além da função de quimioatração, pode atuar como um dos fatores responsáveis para que as células CCR5<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CXCR3<sup>+</sup>/RANKL<sup>+</sup> avaliadas neste estudo produzam os fatores de destruição tecidual RANKL e MMPs.

Como já abordado anteriormente, o receptor CCR5 revelou ter influência sobre a migração das células inflamatórias totais e especificamente das células RANKL<sup>+</sup>, desde que nos camundongos CCR5-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans* a quantidade de células inflamatórias totais e células RANKL<sup>+</sup> recuperadas dos tecidos periodontais doentes foi menor do que nos animais WT (Fig. 3 e 5). É importante considerar que mesmo na ausência do CCR5, um número considerável de células CXCR3<sup>+</sup>/RANKL<sup>+</sup> ainda migraram para os tecidos periodontais (Fig. 3 e 5), provavelmente quimioatraídas pelo eixo CXCR3-CXCL10, desde que a quimiocina CXCL10 é encontrada em altos níveis nos tecidos periodontais doentes de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans* (GARLET et al., 2005). De fato a expressão CXCL10 está relacionada à destruição óssea na artrite reumatóide (KWAK et al., 2008), demonstrando que esta via também participa do processo de destruição tecidual.

O fato de determinadas células, como os linfócitos Th1 estudados aqui, possuírem mais de um receptor de quimiocina, possibilita que haja mais de um mecanismo de

---

---

quimioatração, tornando a regulação do processo inflamatório um evento complexo onde a ausência de uma via pode ser substituída por outra, como é demonstrado neste estudo, onde, apesar da ausência do CCR5, ainda existe migração das células via outro mecanismo, embora menor. Não só o fato de haver mais de um receptor, há também a existência de quimiocinas diferentes que se ligam num mesmo receptor, como no caso das quimiocinas CCL3, CCL4 e CCL5, que se ligam ao receptor CCR5, podendo na ausência de uma delas, outra realizar a função necessária. De fato, resultados preliminares deste grupo de estudo demonstram que a ausência de CCL3 não é suficiente para diminuir a severidade da doença periodontal experimental (dados não mostrados). De certo ponto de vista, isso pode ser uma vantagem em indivíduos com deficiência ou falha em um ou outro fator, possibilitando que o organismo tenha outras formas de executar seu papel de defesa.

Outro aspecto importante avaliado neste estudo, de responsabilidade da resposta imunológica, é o controle da infecção. O Papel do IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  tem sido considerado como responsável pela ativação dos macrófagos e pela produção de óxido nítrico, controlando assim a infecção por microorganismos (BLIX e HELGELAND, 1998; ALLAKER et al., 2001; SILVA, MACHADO e MARTINS, 2003). Neste estudo verificou-se que, apesar dos níveis menores de expressão de mRNA de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  causados pela ausência do CCR5, o controle da infecção bacteriana não foi afetado, uma vez que a carga de DNA de *A. actinomycetemcomitans* nos tecidos de animais deficientes de CCR5 e de animais de linhagem selvagem foi semelhante (Fig. 13), mesmo com a tendência de diminuição dos níveis de MPO e mRNA de iNOS encontrada neste estudo (Fig. 12).

Estudos em animais com deficiência no receptor para TNF demonstraram que não há controle efetivo da infecção por diversos patógenos na ausência da ação do TNF (PFEFFER et al., 1993; MIZGERD, SPIEKER e DOERSCHUK, 2001), causando perda de peso, diminuição dos níveis de MPO e iNOS além do aumento dos níveis de proteína c-reativa (GARLET et al., 2007). Da mesma forma animais com deficiência para IFN- $\gamma$  também não exibem controle efetivo da infecção, principalmente pela diminuição da produção de NO (SOUTO et al., 2000; ALIBERTI et al., 2001; BASTOS et al., 2007) podendo em certas situações ocorrer o óbito (GARLET et al., 2008). Mediante estes fatos, os resultados deste estudo demonstram que a diminuição dos níveis de expressão de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  não é crítica para o controle da infecção por *A. actinomycetemcomitans* como é a ausência ou não-responsividade a tais fatores, como demonstram os estudos citados acima. Estes fatos indicam um caminho promissório para interferência no processo patogênico destrutivo da doença

---

---

periodontal através de inibidores de CCR5 como o met-RANTES (PROUDFOOT et al., 1996; PROUDFOOT et al., 2003) uma vez que o processo inflamatório danoso aos tecidos moles e ósseos periodontais é diminuído na ausência de CCR5 sem, contudo, interferir no controle de infecção bacteriana. Em concordância com estes resultados, um estudo com animais deficientes de CCR5 infectados por *Mycobacterium tuberculosis* demonstrou não haver diferença na carga bacteriana entre os animais KO e os WT (ALGOOD e FLYNN, 2004).

Sendo assim, as células que expressam o receptor CCR5+ participam da doença periodontal como moduladoras dos diversos processos envolvidos na patogênese da doença. A participação do receptor CCR5 começa desde o início da resposta imune adaptativa, tornando as células Th1, as quais demonstraram ser a maioria que expressam este receptor neste modelo de doença periodontal, responsivas às quimiocinas como CCL3, CCL4 e CCL5, fazendo com que estas células migrem para o local da infecção. Uma vez que as células CCR5+ estão presentes nos tecidos periodontais estas se mostram importantes moduladoras de quimiocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ , que por sua vez influenciam na produção de fatores como as MMPs e RANKL, que geram destruição dos tecidos moles e osso alveolar, respectivamente. Além dessa participação indireta sobre a destruição do tecido ósseo alveolar, as células CCR5+ também se mostram capazes de produzir o RANKL, interferindo diretamente sobre o osso alveolar. Um fato interessante encontrado neste estudo é que a ausência das células CCR5+ não interfere no controle da infecção periodontal por *A. actinomycetemcomitans*, contudo, a ausência destas células resultou em menores níveis de citocinas, MMPs e RANKL, diminuindo assim a severidade da doença periodontal.

Como visto até aqui, o sistema de defesa imunológica, que possui como principal atributo a defesa do organismo, mas pode também ser responsável por danos a ele, como no caso da doença periodontal, é um sistema bastante complexo. Como citado anteriormente, este sistema envolve diversos fatores como o tipo de estímulo antigênico, o tipo de citocinas e quimiocinas produzidos e a expressão seletiva de seus receptores. Tendo como exemplo o mecanismo de quimioatração, que envolve a produção de quimiocinas e a expressão de receptores específicos para cada uma delas, nota-se que isto por si só já exhibe certo grau de complexidade, uma vez que uma ou mais quimiocinas podem se ligar ao mesmo receptor ou mesmo um ou mais receptores podem estar expressos na superfície celular tornando a célula responsiva a diferentes quimiocinas. Estudos ainda não publicados deste grupo de pesquisa que demonstram que a ausência de determinada quimiocina, a CCL3, não leva à diminuição

---

da severidade da doença periodontal, juntamente com os resultados deste estudo, nos conduzem a concluir que intervir no receptor resulta em efeitos potencialmente mais amplos do que nas quimiocinas individualmente, uma vez que, ao inibir um receptor de quimiocina qualquer, automaticamente desarma-se a função de uma ou mais quimiocinas que se utilizem de tal receptor. Assim, ao inibir ou bloquear o receptor CCR5, faz-se com que não só a quimiocina CCL3, mas também as quimiocinas CCL4, CCL5 e outras que utilizam os mesmos receptores, não desempenhem suas funções.

Estes fatos tornam as células CCR5+ um alvo de grande interesse para futuras terapias, uma vez que interferindo em tais células poderia haver uma efetiva redução da severidade da doença periodontal sem, contudo, interferir no controle da infecção bacteriana, já que a ação terapêutica seria direta sobre o principal fator modulador da destruição periodontal, diferente das terapias convencionais com drogas anti-inflamatórias, que tentam modular a ação de fatores inflamatórios, ou sobre fatores responsáveis pela destruição dos tecidos moles, como o uso da doxiciclina que age interferindo na ação das MMPs (PRESHAW et al., 2004).

---

***C**onclusões*









## 6 CONCLUSÕES

Mediante os resultados deste modelo de doença periodontal experimental induzida por *A. actinomycetemcomitans* discutidos aqui, pode-se concluir que as células CCR5+ presentes nos tecidos periodontais:

- 1- São em sua maioria, células T do subtipo Th1.
  - 2- São importantes moduladoras da expressão de citocinas Th1 (IFN- $\gamma$ ) e pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) no microambiente periodontal.
  - 3- Expressam e modulam a expressão de RANKL, influenciando diretamente a destruição óssea alveolar.
  - 4- Modulam a expressão de MMPs, influenciando diretamente a destruição dos tecidos moles periodontais.
  - 5- Não interferem no controle da infecção periodontal.
  - 6- São potenciais alvos para intervenção terapêutica visando ao controle das doenças periodontais.
-







## *Referências Bibliográficas*









## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Consensus report. Periodontal diseases: epidemiology and diagnosis. *Ann Periodontol*. 1996 Nov;1(1):216-22.

The pathogenesis of periodontal diseases. *J Periodontol*. 1999 Apr;70(4):457-70.

Abe M, Hiura K, Wilde J, Moriyama K, Hashimoto T, Ozaki S, et al. Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Blood*. 2002 Sep 15;100(6):2195-202.

Achong R, Nishimura I, Ramachandran H, Howell TH, Fiorellini JP, Karimbux NY. Membrane type (MT) 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 expression in ligature-induced periodontitis in the rat. *J Periodontol*. 2003 Apr;74(4):494-500.

Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, et al. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol*. 2003 May;23(3):147-61.

Aiba T, Akeno N, Kawane T, Okamoto H, Horiuchi N. Matrix metalloproteinases-1 and -8 and TIMP-1 mRNA levels in normal and diseased human gingivae. *Eur J Oral Sci*. 1996 Oct-Dec;104(5-6):562-9.

Algood HM, Flynn JL. CCR5-deficient mice control *Mycobacterium tuberculosis* infection despite increased pulmonary lymphocytic infiltration. *J Immunol*. 2004 Sep 1;173(5):3287-96.

Aliberti JC, Machado FS, Souto JT, Campanelli AP, Teixeira MM, Gazzinelli RT, et al. beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 1999 Sep;67(9):4819-26.

---

Aliberti JC, Souto JT, Marino AP, Lannes-Vieira J, Teixeira MM, Farber J, et al. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol*. 2001 Apr;158(4):1433-40.

Allaker RP, Silva Mendez LS, Hardie JM, Benjamin N. Antimicrobial effect of acidified nitrite on periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol*. 2001 Aug;16(4):253-6.

Alpagot T, Bell C, Lundergan W, Chambers DW, Rudin R. Longitudinal evaluation of GCF MMP-3 and TIMP-1 levels as prognostic factors for progression of periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2001 Apr;28(4):353-9.

Amabile N, Susini G, Pettenati-Soubayroux I, Bonello L, Gil JM, Arques S, et al. Severity of periodontal disease correlates to inflammatory systemic status and independently predicts the presence and angiographic extent of stable coronary artery disease. *J Intern Med*. 2008 Jun;263(6):644-52.

Andersen TL, del Carmen Ovejero M, Kirkegaard T, Lenhard T, Foged NT, Delaisse JM. A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells. *Bone*. 2004 Nov;35(5):1107-19.

Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol*. 1998 Jan 1;160(1):403-9.

Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med*. 2001 Aug;250(2):91-104.

Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*. 2002 Oct 1;115(Pt 19):3719-27.

Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microbes Infect*. 2000 Aug;2(10):1181-92.

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

---

Bastos KR, Barboza R, Sardinha L, Russo M, Alvarez JM, Lima MR. Role of endogenous IFN-gamma in macrophage programming induced by IL-12 and IL-18. *J Interferon Cytokine Res.* 2007 May;27(5):399-410.

Belkaid Y, Von Stebut E, Mendez S, Lira R, Caler E, Bertholet S, et al. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol.* 2002 Apr 15;168(8):3992-4000.

Bessis N, Boissier MC. Novel pro-inflammatory interleukins: potential therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine.* 2001 Dec;68(6):477-81.

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

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4(2):197-250.

Bjornsson MJ, Havemose-Poulsen A, Stoltze K, Holmstrup P. Influence of the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) on periodontal bone destruction in Sprague-Dawley rats. *J Periodontal Res.* 2004 Aug;39(4):269-74.

Blix IJ, Helgeland K. LPS from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and production of nitric oxide in murine macrophages J774. *Eur J Oral Sci.* 1998 Feb;106(1):576-81.

Bogdan C. The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Curr Opin Immunol.* 2000 Aug;12(4):419-24.

Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol.* 2001 Feb;11(2):66-75.

Bokoch GM. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood.* 1995 Sep 1;86(5):1649-60.

Brombacher F, Kastelein RA, Alber G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends Immunol.* 2003 Apr;24(4):207-12.

Brubaker JO, Montaner LJ. Role of interleukin-13 in innate and adaptive immunity. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2001 Jun;47(4):637-51.

---

Cesar Neto JB, de Souza AP, Barbieri D, Moreno H, Jr., Sallum EA, Nociti FH, Jr. Matrix metalloproteinase-2 may be involved with increased bone loss associated with experimental periodontitis and smoking: a study in rats. *J Periodontol.* 2004 Jul;75(7):995-1000.

Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem.* 2003 Nov;253(1-2):269-85.

Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol.* 2008 Aug;79(8 Suppl):1569-76.

Craig RG, Yip JK, So MK, Boylan RJ, Socransky SS, Haffajee AD. Relationship of destructive periodontal disease to the acute-phase response. *J Periodontol.* 2003 Jul;74(7):1007-16.

Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, et al. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontal Res.* 2003 Aug;38(4):380-7.

D'Aiuto F, Parkar M, Andreou G, Suvan J, Brett PM, Ready D, et al. Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. *J Dent Res.* 2004 Feb;83(2):156-60.

Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF, Jr. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest.* 1989 Aug;84(2):678-85.

Dietrich T, Garcia RI. Associations between periodontal disease and systemic disease: evaluating the strength of the evidence. *J Periodontol.* 2005 Nov;76(11 Suppl):2175-84.

Ebersole JL, Cappelli D. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. *Periodontol 2000.* 2000 Jun;23:19-49.

Ebersole JL, Cappelli D, Holt SC. Periodontal diseases: to protect or not to protect is the question? *Acta Odontol Scand.* 2001 Jun;59(3):161-6.

Ebersole JL, Taubman MA. The protective nature of host responses in periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 1994 Jun;5:112-41.

---

Ejeil AL, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, Godeau G, Gogly B. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingiva. *J Periodontol.* 2003 Feb;74(2):188-95.

Emingil G, Atilla G, Sorsa T, Luoto H, Kirilmaz L, Baylas H. The effect of adjunctive low-dose doxycycline therapy on clinical parameters and gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels in chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2004 Jan;75(1):106-15.

Folwaczny M, Glas J, Torok HP, Fricke K, Folwaczny C. Prevalence of the chemokine receptor CCR5-Delta32 gene mutation in periodontal disease. *Clin Immunol.* 2003 Dec;109(3):325-9.

Fowler EB, Breault LG, Cuenin MF. Periodontal disease and its association with systemic disease. *Mil Med.* 2001 Jan;166(1):85-9.

Gale LM, McColl SR. Chemokines: extracellular messengers for all occasions? *Bioessays.* 1999 Jan;21(1):17-28.

Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *J Periodontal Res.* 2001 Jun;36(3):194-203.

Gamonal J, Bascones A, Jorge O, Silva A. Chemokine RANTES in gingival crevicular fluid of adult patients with periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000 Sep;27(9):675-81.

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.

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

Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Garlet TP, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. The essential role of IFN-gamma in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *Microbes Infect.* 2008 Apr;10(5):489-96.

---

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.

Garlet GP, Martins W, Jr., Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2003 Apr;38(2):210-7.

Garlet GP, Martins W, Jr., Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2004 Aug;31(8):671-9.

Garred P, Madsen HO, Petersen J, Marquart H, Hansen TM, Freiesleben Sorensen S, et al. CC chemokine receptor 5 polymorphism in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1998 Aug;25(8):1462-5.

Gemmell E, Carter CL, Seymour GJ. Chemokines in human periodontal disease tissues. *Clin Exp Immunol*. 2001 Jul;125(1):134-41.

Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2004;35:21-41.

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

Gibson FC, 3rd, Hong C, Chou HH, Yumoto H, Chen J, Lien E, et al. Innate immune recognition of invasive bacteria accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2004 Jun 8;109(22):2801-6.

Golub LM, McNamara TF, Ryan ME, Kohut B, Blieden T, Payonk G, et al. Adjunctive treatment with subantimicrobial doses of doxycycline: effects on gingival fluid collagenase activity and attachment loss in adult periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2001 Feb;28(2):146-56.

Gorska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2003 Dec;30(12):1046-52.

---

Grassi F, Cristino S, Toneguzzi S, Piacentini A, Facchini A, Lisignoli G. CXCL12 chemokine up-regulates bone resorption and MMP-9 release by human osteoclasts: CXCL12 levels are increased in synovial and bone tissue of rheumatoid arthritis patients. *J Cell Physiol.* 2004 May;199(2):244-51.

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

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

Graves DT, Delima AJ, Assuma R, Amar S, Oates T, Cochran D. Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis. *J Periodontol.* 1998 Dec;69(12):1419-25.

Grayson R, Douglas CW, Heath J, Rawlinson A, Evans GS. Activation of human matrix metalloproteinase 2 by gingival crevicular fluid and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Periodontol.* 2003 Jun;30(6):542-50.

Hamilton TA, Ohmori Y, Tebo J. Regulation of chemokine expression by antiinflammatory cytokines. *Immunol Res.* 2002;25(3):229-45.

Hamilton TA, Ohmori Y, Tebo JM, Kishore R. Regulation of macrophage gene expression by pro- and anti-inflammatory cytokines. *Pathobiology.* 1999;67(5-6):241-4.

Han YW, Redline RW, Li M, Yin L, Hill GB, McCormick TS. *Fusobacterium nucleatum* induces premature and term stillbirths in pregnant mice: implication of oral bacteria in preterm birth. *Infect Immun.* 2004 Apr;72(4):2272-9.

Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand.* 2007 Feb;65(1):1-13.

Henderson B, Wilson M, Sharp L, Ward JM. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Med Microbiol.* 2002 Dec;51(12):1013-20.

Houri-Haddad Y, Wilensky A, Shapira L. T-cell phenotype as a risk factor for periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2007;45:67-75.

---

Hsu DH, Moore KW, Spits H. Differential effects of IL-4 and IL-10 on IL-2-induced IFN-gamma synthesis and lymphokine-activated killer activity. *Int Immunol*. 1992 May;4(5):563-9.

Ide M, Jagdev D, Coward PY, Crook M, Barclay GR, Wilson RF. The short-term effects of treatment of chronic periodontitis on circulating levels of endotoxin, C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6. *J Periodontol*. 2004 Mar;75(3):420-8.

Iredale JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997 Jan;29(1):43-54.

Jarnicki AG, Fallon PG. T helper type-2 cytokine responses: potential therapeutic targets. *Curr Opin Pharmacol*. 2003 Aug;3(4):449-55.

Jotwani R, Muthukuru M, Cutler CW. Increase in HIV receptors/co-receptors/alpha-defensins in inflamed human gingiva. *J Dent Res*. 2004 May;83(5):371-7.

Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis*. 2002 May;8(3):147-59.

Kawai T, Seki M, Watanabe H, Eastcott JW, Smith DJ, Taubman MA. T(h)1 transmigration anergy: a new concept of endothelial cell-T cell regulatory interaction. *Int Immunol*. 2000 Jun;12(6):937-48.

Kiili M, Cox SW, Chen HY, Wahlgren J, Maisi P, Eley BM, et al. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. *J Clin Periodontol*. 2002 Mar;29(3):224-32.

Kim HK, Park HR, Sul KH, Chung HY, Chung J. Induction of RANTES and CCR5 through NF-kappaB activation via MAPK pathway in aged rat gingival tissues. *Biotechnol Lett*. 2006 Jan;28(1):17-23.

Kinane DF, Attstrom R. Advances in the pathogenesis of periodontitis. Group B consensus report of the fifth European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6:130-1.

Kinane DF, Darby IB, Said S, Luoto H, Sorsa T, Tikanoja S, et al. Changes in gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels during periodontal treatment and maintenance. *J Periodontal Res*. 2003 Aug;38(4):400-4.

---



Kinane DF, Lappin DF. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol Scand.* 2001 Jun;59(3):154-60.

Kubota T, Nomura T, Takahashi T, Hara K. Expression of mRNA for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontitis-affected human gingival tissue. *Arch Oral Biol.* 1996 Mar;41(3):253-62.

Kut-Lasserre C, Miller CC, Ejeil AL, Gogly B, Dridi M, Piccardi N, et al. Effect of avocado and soybean unsaponifiables on gelatinase A (MMP-2), stromelysin 1 (MMP-3), and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (TIMP-1 and TIMP-2) secretion by human fibroblasts in culture. *J Periodontol.* 2001 Dec;72(12):1685-94.

Kwak HB, Ha H, Kim HN, Lee JH, Kim HS, Lee S, et al. Reciprocal cross-talk between RANKL and interferon-gamma-inducible protein 10 is responsible for bone-erosive experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008 May;58(5):1332-42.

Lalla E, Lamster IB, Hofmann MA, Bucciarelli L, Jerud AP, Tucker S, et al. Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Aug 1;23(8):1405-11.

Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res.* 2000 May;46(2):214-24.

Lindell DM, Standiford TJ, Mancuso P, Leshen ZJ, Huffnagle GB. Macrophage inflammatory protein 1alpha/CCL3 is required for clearance of an acute *Klebsiella pneumoniae* pulmonary infection. *Infect Immun.* 2001 Oct;69(10):6364-9.

Linden GJ, McClean K, Young I, Evans A, Kee F. Persistently raised C-reactive protein levels are associated with advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2008 Sep;35(9):741-7.

Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Huang L, Pavlos NJ, Rogers M, et al. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med.* 2003 Jan;11(1):17-21.

Loesche WJ. Bacterial mediators in periodontal disease. *Clin Infect Dis.* 1993 Jun;16 Suppl 4:S203-10.

---

Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol*. 2001 Feb;2(2):102-7.

Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today*. 1999 Jun;20(6):254-7.

Mattila K, Vesanen M, Valtonen V, Nieminen M, Palosuo T, Rasi V, et al. Effect of treating periodontitis on C-reactive protein levels: a pilot study. *BMC Infect Dis*. 2002 Dec 10;2:30.

Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Oct;36(10):1882-6.

Menu E, De Leenheer E, De Raeve H, Coulton L, Imanishi T, Miyashita K, et al. Role of CCR1 and CCR5 in homing and growth of multiple myeloma and in the development of osteolytic lesions: a study in the 5TMM model. *Clin Exp Metastasis*. 2006;23(5-6):291-300.

Mercado FB, Marshall RI, Klestov AC, Bartold PM. Relationship between rheumatoid arthritis and periodontitis. *J Periodontol*. 2001 Jun;72(6):779-87.

Mertz PM, DeWitt DL, Stetler-Stevenson WG, Wahl LM. Interleukin 10 suppression of monocyte prostaglandin H synthase-2. Mechanism of inhibition of prostaglandin-dependent matrix metalloproteinase production. *J Biol Chem*. 1994 Aug 19;269(33):21322-9.

Mittrucker HW, Kaufmann SH. Mini-review: regulatory T cells and infection: suppression revisited. *Eur J Immunol*. 2004 Feb;34(2):306-12.

Mizgerd JP, Spieker MR, Doerschuk CM. Early response cytokines and innate immunity: essential roles for TNF receptor 1 and type I IL-1 receptor during *Escherichia coli* pneumonia in mice. *J Immunol*. 2001 Mar 15;166(6):4042-8.

Mogi M, Otagoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res*. 2004 Feb;83(2):166-9.

Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol*. 2002;29 Suppl 3:10-21; discussion 37-8.

---

Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:165-90.

Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood.* 2000 May 15;95(10):3032-43.

Murphy G. The regulation of connective tissue metalloproteinases by natural inhibitors. *Agents Actions Suppl.* 1991;35:69-76.

Nawrocki B, Polette M, Marchand V, Monteau M, Gillery P, Tournier JM, et al. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human bronchopulmonary carcinomas: quantitative and morphological analyses. *Int J Cancer.* 1997 Aug 7;72(4):556-64.

Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:701-38.

Noack B, Genco RJ, Trevisan M, Grossi S, Zambon JJ, De Nardin E. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *J Periodontol.* 2001 Sep;72(9):1221-7.

Nomura T, Ishii A, Oishi Y, Kohma H, Hara K. Tissue inhibitors of metalloproteinases level and collagenase activity in gingival crevicular fluid: the relevance to periodontal diseases. *Oral Dis.* 1998 Dec;4(4):231-40.

O'Garra A. Interleukins and the immune system 1. *Lancet.* 1989a Apr 29;1(8644):943-7.

O'Garra A. Interleukins and the immune system 2. *Lancet.* 1989b May 6;1(8645):1003-5.

O'Garra A, McEvoy LM, Zlotnik A. T-cell subsets: chemokine receptors guide the way. *Curr Biol.* 1998 Sep 10;8(18):R646-9.

Oba Y, Lee JW, Ehrlich LA, Chung HY, Jelinek DF, Callander NS, et al. MIP-1alpha utilizes both CCR1 and CCR5 to induce osteoclast formation and increase adhesion of myeloma cells to marrow stromal cells. *Exp Hematol.* 2005 Mar;33(3):272-8.

Page RC. Periodontal diseases: a new paradigm. *J Dent Educ.* 1998 Oct;62(10):812-21.

---

Parsons CJ, Bradford BU, Pan CQ, Cheung E, Schauer M, Knorr A, et al. Antifibrotic effects of a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 antibody on established liver fibrosis in rats. *Hepatology*. 2004 Nov;40(5):1106-15.

Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:929-79.

Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, et al. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell*. 1993 May 7;73(3):457-67.

Preshaw PM, Hefti AF, Jepsen S, Etienne D, Walker C, Bradshaw MH. Subantimicrobial dose doxycycline as adjunctive treatment for periodontitis. A review. *J Clin Periodontol*. 2004 Sep;31(9):697-707.

Proudfoot AE, Power CA, Hoogewerf AJ, Montjovent MO, Borlat F, Offord RE, et al. Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *J Biol Chem*. 1996 Feb 2;271(5):2599-603.

Proudfoot AE, Power CA, Rommel C, Wells TN. Strategies for chemokine antagonists as therapeutics. *Semin Immunol*. 2003 Feb;15(1):57-65.

Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, et al. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest*. 1998 Feb 15;101(4):746-54.

Ramamurthy NS, Xu JW, Bird J, Baxter A, Bhogal R, Wills R, et al. Inhibition of alveolar bone loss by matrix metalloproteinase inhibitors in experimental periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2002 Feb;37(1):1-7.

Raport CJ, Gosling J, Schweickart VL, Gray PW, Charo IF. Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha. *J Biol Chem*. 1996 Jul 19;271(29):17161-6.

Reddy MS, Geurs NC, Gunsolley JC. Periodontal host modulation with antiproteinase, anti-inflammatory, and bone-sparing agents. A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003 Dec;8(1):12-37.

Reynolds JJ. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Dis*. 1996 Mar;2(1):70-6.

---

Reynolds JJ, Hembry RM, Meikle MC. Connective tissue degradation in health and periodontal disease and the roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors. *Adv Dent Res*. 1994 Jul;8(2):312-9.

Roberts FA, McCaffery KA, Michalek SM. Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodontitis. *J Dent Res*. 1997 Dec;76(12):1833-9.

Robinson SC, Scott KA, Balkwill FR. Chemokine stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-9 requires endogenous TNF-alpha. *Eur J Immunol*. 2002 Feb;32(2):404-12.

Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science*. 2000 Sep 1;289(5484):1508-14.

Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. 1997 Aug 1;90(3):909-28.

Romas E, Gillespie MT, Martin TJ. Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone*. 2002 Feb;30(2):340-6.

Roodman GD, Choi SJ. MIP-1 alpha and myeloma bone disease. *Cancer Treat Res*. 2004;118:83-100.

Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:217-42.

Rousset F, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu DH, et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Mar 1;89(5):1890-3.

Saidenberg-Kermanac'h N, Bessis N, Lemeiter D, de Vernejoul MC, Boissier MC, Cohen-Solal M. Interleukin-4 cellular gene therapy and osteoprotegerin decrease inflammation-associated bone resorption in collagen-induced arthritis. *J Clin Immunol*. 2004 Jul;24(4):370-8.

Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:531-62.

---

Salvi GE, Brown CE, Fujihashi K, Kiyono H, Smith FW, Beck JD, et al. Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. *J Periodontal Res.* 1998 May;33(4):212-25.

Sato N, Kuziel WA, Melby PC, Reddick RL, KostECKI V, Zhao W, et al. Defects in the generation of IFN-gamma are overcome to control infection with *Leishmania donovani* in CC chemokine receptor (CCR) 5-, macrophage inflammatory protein-1 alpha-, or CCR2-deficient mice. *J Immunol.* 1999 Nov 15;163(10):5519-25.

Saunders J, Tarby CM. Opportunities for novel therapeutic agents acting at chemokine receptors. *Drug Discov Today.* 1999 Feb;4(2):80-92.

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.

Scheven BA, Milne JS, Hunter I, Robins SP. Macrophage-inflammatory protein-1alpha regulates preosteoclast differentiation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Jan 27;254(3):773-8.

Seguier S, Gogly B, Bodineau A, Godeau G, Brousse N. Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cells and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival tissue? *J Periodontol.* 2001 Oct;72(10):1398-406.

Sezer O, Heider U, Zavrski I, Kuhne CA, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease. *Blood.* 2003 Mar 15;101(6):2094-8.

Sigusch B, Klinger G, Glockmann E, Simon HU. Early-onset and adult periodontitis associated with abnormal cytokine production by activated T lymphocytes. *J Periodontol.* 1998 Oct;69(10):1098-104.

Silva JS, Machado FS, Martins GA. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. *Front Biosci.* 2003 May 1;8:s314-25.

Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res.* 2007 Apr;86(4):306-19.

Slade GD, Offenbacher S, Beck JD, Heiss G, Pankow JS. Acute-phase inflammatory response to periodontal disease in the US population. *J Dent Res.* 2000 Jan;79(1):49-57.

---

Smith PC, Munoz VC, Collados L, Oyarzun AD. In situ detection of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in gingival epithelium in human periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2004 Apr;39(2):87-92.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000. 2002;28:12-55.

Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, Pfeffer K, Rossi MA, Silva JS. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol.* 2000 May;156(5):1811-20.

Souza MH, Lemos HP, Oliveira RB, Cunha FQ. Gastric damage and granulocyte infiltration induced by indomethacin in tumour necrosis factor receptor 1 (TNF-R1) or inducible nitric oxide synthase (iNOS) deficient mice. *Gut.* 2004 Jun;53(6):791-6.

Stern J, Shai E, Zaks B, Halabi A, Houry-Haddad Y, Shapira L, et al. Reduced expression of gamma interferon in serum and marked lymphoid depletion induced by *Porphyromonas gingivalis* increase murine morbidity and mortality due to cytomegalovirus infection. *Infect Immun.* 2004 Oct;72(10):5791-8.

Sun XJ, Meng HX, Shi D, Xu L, Zhang L, Chen ZB, et al. Elevation of C-reactive protein and interleukin-6 in plasma of patients with aggressive periodontitis. *J Periodontal Res.* 2008 Oct 7.

Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:713-58.

Szekanecz Z, Kim J, Koch AE. Chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis. *Semin Immunol.* 2003 Feb;15(1):15-21.

Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodontal Res.* 2005 Aug;40(4):287-93.

Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol.* 2007 Apr;7(4):292-304.

Takayanagi H, Sato K, Takaoka A, Taniguchi T. Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. *Immunol Rev.* 2005 Dec;208:181-93.

---

Takeichi O, Haber J, Kawai T, Smith DJ, Moro I, Taubman MA. Cytokine profiles of T-lymphocytes from gingival tissues with pathological pocketing. *J Dent Res.* 2000 Aug;79(8):1548-55.

Talvani A, Santana G, Barcelos LS, Ishii S, Shimizu T, Romanha AJ, et al. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in platelet-activating factor receptor-deficient mice. *Microbes Infect.* 2003 Jul;5(9):789-96.

Taubman MA, Kawai T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001;12(2):125-35.

Teitelbaum SL. Osteoclasts, integrins, and osteoporosis. *J Bone Miner Metab.* 2000;18(6):344-9.

Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol.* 2002 Jun;18(6):262-5.

Teng YT. Mixed periodontal Th1-Th2 cytokine profile in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-specific osteoprotegerin ligand (or RANK-L)- mediated alveolar bone destruction in vivo. *Infect Immun.* 2002 Sep;70(9):5269-73.

Teng YT. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(4):237-52.

Teng YT, Nguyen H, Gao X, Kong YY, Gorczynski RM, Singh B, et al. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest.* 2000 Sep;106(6):R59-67.

Tervahartiala T, Pirila E, Ceponis A, Maisi P, Salo T, Tuter G, et al. The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2, -8, -13, and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. *J Dent Res.* 2000 Dec;79(12):1969-77.

Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 Dec;15(6):457-75.

---



Tonetti MS, Imboden MA, Gerber L, Lang NP, Laissue J, Mueller C. Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. *Infect Immun*. 1994 Sep;62(9):4005-14.

Tuter G, Kurtis B, Serdar M. Effects of phase I periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J Periodontol*. 2002 May;73(5):487-93.

Ukai T, Mori Y, Onoyama M, Hara Y. Immunohistological study of interferon-gamma- and interleukin-4-bearing cells in human periodontitis gingiva. *Arch Oral Biol*. 2001 Oct;46(10):901-8.

van der Zee E, Everts V, Beertsen W. Cytokines modulate routes of collagen breakdown. Review with special emphasis on mechanisms of collagen degradation in the periodontium and the burst hypothesis of periodontal disease progression. *J Clin Periodontol*. 1997 May;24(5):297-305.

Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003 May 2;92(8):827-39.

Wang CR, Liu MF. Regulation of CCR5 expression and MIP-1alpha production in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2003 May;132(2):371-8.

Wedderburn LR, Robinson N, Patel A, Varsani H, Woo P. Selective recruitment of polarized T cells expressing CCR5 and CXCR3 to the inflamed joints of children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2000 Apr;43(4):765-74.

Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell*. 1997 Nov 14;91(4):439-42.

Wiebe CB, Adkins CA, Putnins EE, Hakkinen L, Larjava HS. Naturally occurring periodontal bone loss in the wild deer mouse, genus *Peromyscus*. *J Periodontol*. 2001 May;72(5):620-5.

Yamashita M, Ukai-Tadenuma M, Kimura M, Omori M, Inami M, Taniguchi M, et al. Identification of a conserved GATA3 response element upstream proximal from the interleukin-13 gene locus. *J Biol Chem*. 2002 Nov 1;277(44):42399-408.

Yamazaki K, Yoshie H, Seymour GJ. T cell regulation of the immune response to infection in periodontal diseases. *Histol Histopathol*. 2003 Jul;18(3):889-96.

---

Yang YF, Mukai T, Gao P, Yamaguchi N, Ono S, Iwaki H, et al. A non-peptide CCR5 antagonist inhibits collagen-induced arthritis by modulating T cell migration without affecting anti-collagen T cell responses. *Eur J Immunol.* 2002 Aug;32(8):2124-32.

Yuan GH, Masuko-Hongo K, Sakata M, Tsuruha J, Onuma H, Nakamura H, et al. The role of C-C chemokines and their receptors in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2001 May;44(5):1056-70.

Zapico I, Coto E, Rodriguez A, Alvarez C, Torre JC, Alvarez V. CCR5 (chemokine receptor-5) DNA-polymorphism influences the severity of rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* 2000;1(4):288-9.

---

***A****nexos*







**ANEXO A****Parecer da comissão de Ética em Experimentação Animal da FOB-USP**

**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Odontologia de Bauru**  
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73  
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

*Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais*  
Fone: (14)3235-8356  
e-mail: [mferrari@fob.usp.br](mailto:mferrari@fob.usp.br)

**CEEPA-Proc. Nº 016/2007**

Bauru, 13 de março de 2008.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado "**Modulação da severidade da doença periodontal experimental por células CCR5+**", de autoria de Samuel de Barros Ferreira Junior, sob sua orientação, aprovado "*ad referendum*" desta Comissão, foi apreciado e referendado em reunião realizada no dia 12 de março de 2008.

Atenciosamente,

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf  
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e  
Pesquisa em Animais

**Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet**  
Docente do Departamento de Ciências Biológicas









## ANEXO B

Seqüências dos *primers*, propriedades da reação e do produto de amplificação

|                 | Seqüência <i>primer sense</i><br>Seqüência <i>primer anti-sense</i> | <i>tA</i> (°C) | <i>tM</i> (°C) | bp  |
|-----------------|---|----------------|----------------|-----|
| IL-1 $\beta$    | GGAAGATTCTGAAGAAGAGACGG<br>TGAGATTTTTAGAGTAACAGG                    | 58             | 79             | 329 |
| TNF- $\alpha$   | AAGCCTGTAGCCCATGTTGT<br>CAGATAGATGGGCTCATACC                        | 56             | 79             | 330 |
| IFN- $\gamma$   | AT GAAATATACAAGTTATATCATG<br>TGTTTCGAGGTCGAAGAGCATCCC               | 58             | 77             | 501 |
| IL-10           | AGATC TCCGAGATGCCTTCA<br>CCGTGGAGCAGGTGAAGAAT                       | 58             | 85             | 307 |
| CXCL1           | ATTGTATGGTCAACACGCACG<br>TTTGAACGTCTCTGTCCCGAG                      | 58             | 79             | 134 |
| CXCL2           | AAGTTTGCCTTGACCCTGAA<br>AGGCACATCAGGTACGATCC                        | 60             | 80             | 180 |
| MMP-1           | TGGACCTGGAGGAAATCTTGC<br>AGAGTCCAAGAGAATGGCCGA                      | 58             | 79             | 155 |
| MMP-2           | CTGATGGCACCCATTTACACCT<br>GATCTGAGCGATGCCATCAAA                     | 60             | 82             | 186 |
| MMP-13          | AGAGATGCGTGGAGAGTCGAA<br>AAGGTTTGGAATCTGCCCAGG                      | 65             | 85             | 162 |
| TIMP-1          | ACTGCAGGATGGACTCTTGCA<br>TTTCAGAGCCTTGAGAGGACT                      | 58             | 82             | 206 |
| TIMP-3          | TTCTCAGCGAGGATGGCACTT<br>AAACACGGTTCAGGATGCTGG                      | 60             | 81             | 200 |
| RANKL           | CAGAAGATGGCACTCACTGCA<br>CACCATCGCTTTCTCTGCTCT                      | 60             | 73             | 203 |
| OPG             | GGAACCCAGAGCGAAATACA<br>CCTGAAGAATGCCTCCTCACA                       | 58             | 77             | 225 |
| iNOS            | CGTCATTTCTGTCCGTCTCT<br>TTGCTGGCTGATGGCTGGCG                        | 56             | 82             | 390 |
| $\beta$ -actina | ATGTTTGAGACCTTCAACA<br>CACGTCAGACTTCATGATGG                         | 56             | 75             | 495 |
| <i>A.a.</i>     | ATGCCAACTTGACGTAAAT<br>AAACCCATCTCTGAGTTCTTCTTC                     | 60             | 78             | 357 |

*tA*: Temperatura de *annealing*; *tM*: Temperatura de *Melting*; bp: pares de base do produto de amplificação



