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

YASMIN SIMÕES DAL'ACQUA

Efeitos locais e sistêmicos de diferentes modelos de periodontite experimental em camundongos: uma revisão sistemática

Ribeirão Preto - SP
2022

YASMIN SIMÕES DAL'ACQUA

Efeitos locais e sistêmicos de diferentes modelos de periodontite experimental em camundongos: uma revisão sistemática

Versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutorado em Periodontia.

Área de concentração: Periodontia
Orientadora: Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto

Ribeirão Preto
2022

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

Catalogação da Publicação

Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Dal'Acqua, Yasmin Simões.
Efeitos locais e sistêmicos de diferentes modelos de periodontite experimental em camundongos: uma revisão sistemática; Daniela Bazan Palioto Bulle – Ribeirão Preto, 2022.
83 p.:il.

Dissertação de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP.
Área de concentração: Periodontia.

Versão corrigida da Dissertação/Tese. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa.

1. Modelos experimentais de periodontite; 2. Periodontite; 3. Modelos de camundongos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dal'Acqua, Y. S. **Efeitos locais e sistêmicos de diferentes modelos de periodontite experimental em camundongos: uma revisão sistemática.** 2022. 83f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Periodontia.

Aprovado em: ____/ _____/ _____

Banca Examinadora

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

Instituição:_____

Julgamento: _____Assinatura:_____

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

Instituição:_____

Julgamento: _____Assinatura:_____

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

Instituição:_____

Julgamento: _____Assinatura:_____

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

Instituição:_____

Julgamento: _____Assinatura:_____

Importante não é ver o que ninguém nunca viu, mas sim pensar o que ninguém nunca pensou sobre algo que todo mundo vê.

(Arthur Schopenhauer)

Dedicatória

À Deus,
Pela oportunidade de uma vida abençoada e por sempre iluminar meu caminho durante esta caminhada. Em especial pela benção que me foi concedida de ser mãe e construir minha família. Nesse tempo de gestação ao sentir a vida pulsando em mim consegui entender o Seu poder e amor. Sempre vou ser grata dando o melhor de mim e transmitindo seus ensinamentos onde quer que eu esteja.

Ao meu filho Davi que nem nasceu e já me fez encontrar uma força que eu nem imaginava existir. Durante todos esses meses de sua espera uma mistura de sentimentos invadiram meu coração, me impulsionando sempre a seguir em frente na tentativa de deixar tudo "aqui fora" o mais perfeito e tranquilo para sua chegada; já amo você!

Ao meu marido Alfredo que se fez presente todo o tempo inclusive naqueles momentos em que eu estava desanimada, cansada e nervosa. Agradeço por toda compreensão e dedicação comigo e com a família que estamos formando, juntos vamos em frente descobrindo e vivendo a vida dia após dia. Que a nossa união e o companheirismo esteja sempre presente nos ajudando a superar de uma forma leve e amorosa os desafios que virão. Amo você!

À minha família,
Que sempre incentivaram os meus estudos e não mediram esforços permitindo que eu chegasse à esta etapa da minha vida. Muito obrigada pelo apoio e dedicação, amo vocês.

Agradecimentos

À minha orientadora, **Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto Bulle**,

Obrigada pela confiança e compreensão por tudo que aconteceu na minha vida pessoal no final do doutorado, você sempre com empatia me motivou a seguir. Em tempos de pandemia que diversos projetos foram criados e que não foram possíveis de serem realizados conseguimos lidar com as frustrações e nos adequar ao momento. Meu carinho e gratidão por me permitir dar mais um passo em minha vida profissional.

Ao meu colega e amigo de pós-graduação **Cristhiam Hernández Martínez** que me guiou nesse tema de doutorado, que era um desafio para mim, pois nunca havia aprofundado meus estudos nesse assunto. Ele me ajudou desde os primeiros passos até no final em que eu já estava cansada e sem ânimo. Obrigada!

A todas secretárias do departamento **Bel, Dulce e Dani** que ao longo de todo período de pós-graduação me socorreram e auxiliaram, deram conselhos e sempre com alegria falavam que tudo ia dar certo.

À **Profa. Mariana Fampa Fogacci**, que com dedicação me guiou na produção do artigo científico e com carinho e atenção passou seus ensinamentos, sou grata por ter aprendido com você.

Aos professores do curso de Periodontia, **Prof.Dr. Michel Reis Messora**, **Prof.Dr. Arthur Belém Novaes Junior, Profa.Dra. Flávia Furlaneto, Prof.Dr. Sérgio Luis Scombatti de Souza, Prof.Dr. Mario Taba Junior**, obrigada pelos conhecimentos transmitidos. Meu carinho e gratidão para todos vocês.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP)** da Universidade de São Paulo, **Comissão de Pós-Graduação** e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – **CAPES**.

RESUMO

Dal'Acqua, Y. S. **Efeitos locais e sistêmicos de diferentes modelos de periodontite experimental em camundongos: uma revisão sistemática**. 2022. 83f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Na pesquisa periodontal diversos modelos animais são utilizados para investigar a interação hospedeiro-bactéria e avaliar a etiopatogenia da periodontite. Nesta revisão, abordamos as diferenças metodológicas e seus diferentes desfechos periodontais e sistêmicos na tentativa de esclarecer dúvidas e auxiliar a comunidade científica a escolher com mais precisão o modelo mais adequado ao objetivo do estudo a ser realizado.

Objetivo: Teve como objetivo resumir e comparar o impacto local e sistêmico de diferentes modelos de periodontite experimental em camundongos.

Métodos: Definida a estratégia PICO, foi realizada em seguida a busca de artigos na língua inglesa seguindo as diretrizes do PRISMA nas bases de dados PubMed, Embase, Scopus, Web of Science, Cochrane e LILACS. A estratégia de busca forneceu um total de 8.815 artigos, dos quais foram selecionados estudos experimentais comparando os efeitos locais e/ou sistêmicos de dois ou mais modelos para a indução de periodontite experimental em camundongos de acordo com os critérios de inclusão e exclusão.

Resultados: Após a seleção, 7 artigos que atenderam aos critérios de inclusão para a revisão. Foram analisadas diferenças entre os seguintes modelos experimentais de periodontite em camundongos: ligadura (LIG), gavagem (GAV), injeção de bactérias (I-bact), ligadura embebida em bactérias (LIGbact) e associação entre eles.

Conclusão: Embora a maioria dos modelos experimentais de periodontite sejam eficientes em causar perda óssea alveolar, existem diferenças em suas características. Na LIG, um processo agudo se estabelece e o hospedeiro tende a se reparar, diminuindo a significância dessa perda ao longo do tempo. Nos modelos em que o desafio bacteriano é adicionado (LIGbact, LIGPg, GAV ou I-bact) a perda óssea parece ser significativa com maior tempo de indução, indicando a presença de uma condição crônica. Com relação aos desfechos sistêmicos a GAV apresentou maior potencial de modulação da resposta do hospedeiro com alterações inflamatórias sistêmicas mostrando-se ser mais promissor quando pretende estudar a relação entre periodontite e doenças sistêmicas crônicas.

Palavras-chave: modelos de periodontite; doença periodontal crônica; reabsorção óssea alveolar; revisão sistemática

ABSTRACT

Dal'Acqua, Y.S. **Local and systemic effects of different models of experimental periodontitis in mice: a systematic review.** 2022. 83f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

In periodontal research are used several animal models to investigate the host-bacteria interaction and evaluate the etiopathogenesis of periodontitis. This review addressed the methodological differences and their different periodontal and systemic outcomes in an attempt to clarify doubts and help the scientific community to make a more accurate choice about the most appropriate model according to the objective of each proposed study.

Objective: The objective was to summarize and compare the local and systemic impact of different models of experimental periodontitis in mice.

Methods: Once the PICO strategy was defined, a search for articles in English was carried out following the PRISMA guidelines in PubMed, Embase, Scopus, Web of Science, Cochrane and LILACS databases. The search strategy provided 8,815 articles, from which experimental studies were selected comparing the local and/or systemic effects of two or more models for the induction of experimental periodontitis in mice according to the inclusion and exclusion criteria.

Results: After selection, 7 articles that met the inclusion criteria for the review. Were analyzed differences between the following experimental models of periodontitis in mice: ligation (LIG), gavage (GAV), injection of bacteria (I-bact), ligation embedded in bacteria (LIGbact) and association between them.

Conclusion: Although most experimental models of periodontitis are efficient in causing alveolar bone loss, there are differences in their characteristics. In LIG, an acute process is established and the host tends to repair itself, decreasing the significance of this loss over time. In models where bacterial challenge is added (LIGbact, LIGPg, GAV or I-bact) bone loss appears to be significant with longer induction time, indicating the presence of a chronic condition. Regarding systemic outcomes, GAV showed greater potential for modulating the host's response with systemic inflammatory changes, proving to be more promising when studying the relationship between periodontitis and chronic systemic diseases.

Keywords: periodontitis models; chronic periodontal disease; alveolar bone resorption; systematic review.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 – Resumo das características dos estudos com animais incluídos.....40

Tabela 2 – Métodos de análises usadas nos estudos.....45

Tabela 3 – Análise risco de viés.....54

Figura 1 – Fluxograma PRISMA.....36

Figura 2 – Processo de seleção de estudos com base na avaliação do texto completo estudos.....38

Figura 3 – Biomarcadores por estudo.....49

LISTA DE ANEXO

Anexo 1 – Quadro PRISMA.....74

Anexo 2 – Estratégias de busca em bancos de dados.....78

Anexo 3 – Artigo submetido na revista 82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

BAFF: fator de ativação de células B

CATB: catepsina B

CONTROL: grupo controle

DP: doença periodontal

Fn: *Fusobacterium nucleatum*

GAV: gavagem oral

GAV*Pg*: gavagem com *Porphyromonas gingivalis*

GAV*PgFn*: gavagem com *Porphyromonas gingivalis e Fusobacterium nucleatum*

IL-1β: interleucina 1beta

IL-6: interleucina 6

IL-18: interleucina 18

IL-10: interleucina 10

IL-17: interleucina 17

IP-10: proteína induzida por interferon-gama

I-bact: injeção de bactérias

i-*Pg*: injeção de *Porphyromonas gingivalis*

LPS: lipopolissacarídeo

LIG: ligadura

LIGbact: ligadura embebida em bactérias

LIG*Pg*: ligadura embebida em *Pg*

LIG + GAV: modelo que associa ligadura com gavagem

MMP-9: metaloproteinase - 9

OPG: osteoprotegerina

Pg: *Porphyromonas gingivalis*

RANKL: ativador de receptores do fator nuclear kappa-B ligante

TNF- α: fator necrose tumoral alfa

TGF-β: fator de crescimento transformador beta

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

µCT: microtomografia computadorizada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 REVISÃO DE LITERATURA 21
2.1 Ligadura (LIG) 21
2.2 Ligadura embebida com bactérias (LIGbact) 23
2.3 Gavagem oral (GAV) 24
2.4 Injeção de bactérias (I-bact) 27
3 PROPOSIÇÃO 31
4 MATERIAL E MÉTODOS 33
5. RESULTADOS 38
5.1 Seleção de estudos 38
5.2 Características dos estudos 38
5.3 Periodontite induzida experimentalmente 46
5.4 Confirmação de colonização bacteriana 47
5.5 Análise de perda óssea alveolar 48
5.6 Análise da inflamação do tecido gengival 48
5.7 Análise histológica 50
5.8 Análise imunohistoquímica 51
5.9 Análise de imunofluorescência e imunocitoquímica 51
5.10 Análise da inflamação sistêmica 52
5.11 Análise de risco de viés 53
6. DISCUSSÃO 56
7. CONCLUSÃO 61
REFERÊNCIAS 63
ANEXOS 74

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Na pesquisa periodontal, os modelos animais são importantes para estudar a relação entre doenças e fatores externos como também testar novas abordagens terapêuticas (GRAVES; KANG; ANDRIANKAJA; WADA *et al.*, 2012; MADDEN; CATON, 1994). A seleção do modelo dependerá do objetivo do estudo, mas em geral um modelo de indução de periodontite adequado deve apresentar a capacidade de simular um processo imunoinflamatório semelhante ao observado em humanos resultando em destruição progressiva do tecido conjuntivo, perda óssea e formação de bolsas periodontais (GENCO; VAN DYKE; AMAR, 1998; USUI; ONIZUKA; SATO; KOKABU *et al.*, 2021).

A patogênese da periodontite consistia que periodontopatógenos específicos, como do "complexo vermelho" eram os principais responsáveis para o início dessa doença. No entanto, essa concepção vem sendo modificada, em que gatilho inicial para essa patologia é baseado na sinergia polimicrobiana e a disbiose da microbiota juntamente com uma resposta imune desregulada (HAJISHENGALLIS; LAMONT, 2012; KUMAR, 2021; VAN DYKE; BARTOLD; REYNOLDS, 2020).

Vários modelos animais de diferentes espécies são usados com o intuito de investigar a interação hospedeiro-bactéria e avaliar a patogênese da periodontite entre eles: primatas, suínos, cães, roedores, coelhos, entre outros; cada um apresentando suas vantagens e desvantagens (STRUILLOU; BOUTIGNY; SOUEIDAN; LAYROLLE, 2010). No entanto, encontrar um modelo animal que reproduza todos os aspectos da doença periodontal (DP) é uma meta muito desafiadora, com isso as perguntas e o objetivo do estudo devem ser muito bem definidos para que seja possível a escolha e utilização de modelos corretos e assertivos para a pesquisa proposta (DE MOLON; DE AVILA; CIRELLI, 2013; GRAVES; KANG; ANDRIANKAJA; WADA *et al.*, 2012; OZ; PULEO, 2011).

Os camundongos são comumente usados para estudar a patogenia da DP, incluindo resposta inflamatória do hospedeiro e a indução de perda óssea alveolar (GRAVES; FINE; TENG; VAN DYKE *et al.*, 2008). A este respeito, esses animais constituem um modelo relativamente barato, microbiota controlável, resistência a outras doenças, apresenta riqueza de informações sobre seu sistema imunológico e disponibilidade de linhagens de camundongos transgênicos (LIANG; HOSUR; DOMON; HAJISHENGALLIS, 2010; MADDEN; CATON, 1994).

No século passado, Hirsch e Clarke (1989) alegaram que os micróbios orais humanos não poderiam ser estabelecidos permanentemente nas cavidades orais dos animais, porém dois anos mais tarde Klaussen (1991) argumentou de forma diferente (HIRSCH; CLARKE, 1989; KLAUSEN, 1991). Atualmente vários métodos foram apresentados para introduzir patógenos periodontais na cavidade oral com o intuito de induzir a periodontite como: ligadura (LIG), ligadura embebida com bactérias (LIGbact), injeção de bactérias (I-bact) e gavagem (GAV) (BAKER; DIXON; ROOPENIAN, 2000; DUMITRESCU; ABD-EL-ALEEM; MORALES-AZA; DONALDSON, 2004; LI; AMAR, 2007; VARGAS-SANCHEZ; MORO; SANTOS; ANBINDER *et al.*, 2017).

Em alguns desses modelos um número significativo de bactérias tem sido usadas com sucesso dentre a variedade de espécies bacterianas a *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) tem se mostrado a preferida, pois ela é capaz de se envolver em interações sinérgicas com outros organismos patogênicos em comunidades microbianas subgengivais como: *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum (Fn)*, *Candida albicans*, entre outros (CANABARRO; VALLE; FARIAS; SANTOS *et al.*, 2013; MEURIC; MARTIN; GUYODO; ROUILLON *et al.*, 2013).

Embora esse microrganismo não seja nativo de ratos e camundongos, porém natural da microbiota oral humana tem se mostrado de extrema importância ao orquestrar o desenvolvimento da periodontite, possivelmente pela sua capacidade de interferir na imunidade inata (HAJISHENGALLIS; DIAZ, 2020; HAJISHENGALLIS; LIANG; PAYNE; HASHIM *et al.*, 2011; KIMURA; NAGAI; ONITSUKA; KOGA *et al.*, 2000).

Nosso corpo atua de forma paradoxal ao lidar com os microrganismos que vivem na cavidade oral e a maioria das respostas imunoinflamatórias e epigenéticas são benéficas, pois protegem o hospedeiro contra patógenos invasores (MEDZHITOV, 2008; RICHTER; KRUPPA; KECELI; ATAMAN-DURUEL *et al.*, 2021). No entanto, algumas respostas imunológicas juntamente com os efeitos destrutivos diretos das bactérias também podem causar danos ao hospedeiro, induzindo uma patologia significativa na cavidade oral (JIAO; HASEGAWA; INOHARA, 2014; USUI; ONIZUKA; SATO; KOKABU *et al.*, 2021).

Estudos tem mostrado que esse impacto imunológico não se restringe apenas na boca, pois a disbiose do biofilme oral pode se estender a outras partes do organismo, inclusive o trato intestinal, o que resulta em uma perturbação na comunidade microbiana desses órgãos se associando assim ao desenvolvimento de diversas doenças sistêmicas (HAJISHENGALLIS, 2015; SIMAS; KRAMER; WEINBERG; GENCO, 2021). A

inflamação também tem mostrado importante papel na tentativa da manutenção da homeostase oral, porém quando se torna mais presente no organismo do que o estado de saúde um quadro disbiótico é estabelecido podendo estar relacionado ao desenvolvimento de diversas doenças inflamatórias crônicas em todo o corpo (KLEINSTEIN; NELSON; FREIRE, 2020). Diante do exposto, surge a necessidade de melhor entendimento das vias de ligação existentes entre a condição oral e sistêmica, buscando-se cada vez mais modelos experimentais que viabilizem essas respostas (BECK; PAPAPANOU; PHILIPS; OFFENBACHER, 2019; GENCO; SANZ, 2020).

Além disso, na literatura apesar da variabilidade dos modelos encontrados ainda há uma escassez em estudos que avaliem evolução temporal da inflamação, das alterações macroscópicas e das características histológicas. Que acompanhem e avaliem a progressão e os desfechos da periodontite experimental através de diferentes técnicas de indução; essa avaliação comparativa é de extrema importância na escolha do modelo a ser utilizado e na interpretação dos resultados encontrados.

Sendo assim, esta revisão sistemática teve como objetivo resumir e comparar o impacto local e sistêmico de diferentes modelos de periodontite experimental em camundongos. Espera-se que os resultados aqui encontrados possam ser usados por pesquisadores para auxiliar na decisão de qual modelo experimental de periodontite é mais adequado para seu estudo.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ligadura (LIG)

Modelo de periodontite descrito desde o final dos anos 1960 consiste na colocação de uma ligadura (LIG) retentiva ao redor ou nos espaços interproximais do dente do animal experimental induzindo uma resposta imunoinflamatória local através do trauma mecânico no momento da sua colocação, sendo capaz de favorecer o acúmulo de biofilme e estabelecer uma microbiota disbiótica; recentemente esse modelo também está sendo bem aceito para estudo de peri-implantite e observação da regeneração óssea após a remoção da ligadura (ABE; HAJISHENGALLIS, 2013; MARCHESAN; GIRNARY; JING; MIAO *et al.*, 2018; ROVIN; COSTICH; GORDON, 1966; WONG; HIYARI; YAGHSEZIAN; DAVAR *et al.*, 2018).

Apresenta algumas vantagens como rápida indução da doença promovendo inflamação periodontal e perda óssea alveolar de uma forma aguda, em torno de sete dias (KUHR; POPA-WAGNER; SCHMOLL; SCHWAHN *et al.*, 2004; LIN; NIIMI; OHSUGI; TSUCHIYA *et al.*, 2021); permite o estudo da resposta imune local contra desafios bacterianos se mostrando compatível com o conceito atual da patogênese da periodontite que está associada com a disbiose oral (MARCHESAN; GIRNARY; JING; MIAO *et al.*, 2018).

Ligaduras de seda, elástico e algodão têm sido comumente usadas em ratos, camundongos, cães e macacos (NOVAES; RAMOS; SCOMBATTI DE SOUZA; MUGLIA *et al.*, 2020; OZ; PULEO, 2011; TAMURA; MAEKAWA; HIYOSHI; TERAO, 2021). Embora o procedimento de colocação desse material seja considerado uma limitação desse modelo por causar uma lesão traumática e agravar a ruptura do tecido periodontal (WU; TAYA; KURAJI; ITO *et al.*, 2020), a colocação desse ao redor dos dentes pode servir como um ponto de colonização bacteriana e dar início a uma lesão periodontal (KLAUSEN, 1991).

Em relação ao biofilme dental estabelecido na LIG em ratos esse tem se mostrado semelhante ao observado em doenças humanas, sendo composto por *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (DUARTE; TEZOLIN; FIGUEIREDO; FERES *et al.*, 2010). E com 3 dias após a indução, já é possível observar um aumento no número de bactérias anaeróbicas responsáveis pela periodontite (ABE; HAJISHENGALLIS, 2013).

Dentre os animais experimentais ratos e camundongos mostraram ser compatíveis e versáteis para esse tipo de modelo, porém o tamanho dos dentes dos murinos podem ser um impasse (MARCHESAN; GIRNARY; JING; MIAO *et al.*, 2018). Diante disso, a colocação da LIG pode ser considerada um grande desafio necessitando de um operador calibrado e treinado

com o intuito de minimizar o risco de trauma mecânico. Além do mais, todos os animais precisam ser constantemente verificados quanto à posição das ligaduras certificando-se que estão em posição correta durante todo experimento (OZ; PULEO, 2011).

Mesmo alguns estudos mantendo a LIG em posição entre 15 e 60 dias para que ocorra a indução da destruição periodontal de uma forma progressiva e constante (DE MOLON; MASCARENHAS; DE AVILA; FINOTI *et al.*, 2016; DE MOLON; PARK; JIN; SUGAI *et al.*, 2018; ÇALIŞIR; AKPINAR; POYRAZ; GÖZE *et al.*, 2016).Existe a ideia de que a perda óssea não consegue ser sustentada após retirada do estimulo, ao longo do experimento havendo a necessidade da combinação com bactérias para que seja estabelecido um quadro crônico da periodontite (LIN; NIIMI; OHSUGI; TSUCHIYA *et al.*, 2021; PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019).

Outro pensamento que aponta a possível importância da presença de bactérias para o desenvolvimento desse modelo, se baseia no entendimento que em ratos livres de germes mostram não ser capazes de induzir inflamação e perda óssea alveolar significativa com a LIG (ROVIN; COSTICH; GORDON, 1966); assim como a utilização de antimicrobianos antes da indução pode amenizar a progressão da periodontite nesses modelos (BEZERRA; BRITO; RIBEIRO; ROCHA, 2002).

Seguindo este raciocínio sobre a possível influência bacteriana tanto nos desfechos periodontais como sistêmicos outros tipos de modelos de indução por ligadura tem sido pesquisados como: LIG embebidas em bactérias periodontopatogênicas (KIMURA; NAGAI; ONITSUKA; KOGA *et al.*, 2000; LI; AMAR, 2007; YUAN; GUPTE; ZELKHA; AMAR, 2011), LIG + GAV (PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019), LIG + Inoculação oral (MEULMAN; PERUZZO; STIPP; GONÇALVES *et al.*, 2011) e LIG + I-bact (AKKAOUI; YAMADA; DUARTE; HO *et al.*, 2020).

Além desses modelos que associam LIG a outros métodos serem úteis para o estudo de diferenças imunogênicas e patogênicas entre as bactérias, muitos deles mostraram que também possuem potencial para avaliar os efeitos da periodontite em diversos tipos de doenças sistêmicas (MATA; NOBRE; FELIX SILVA; OLIEZER *et al.*, 2021; QIAN; ZHANG; DUAN; YANG *et al.*, 2021). Tem sido levantada a hipótese que a ligadura por si e a inflamação local provocada por ela também pode gerar efeitos sistêmicos (GALENO; FRANÇA; DA SILVA; ALVES *et al.*, 2021; LI; BAO; CHANG; WANG *et al.*, 2021; RIBEIRO; SANTOS-JUNIOR; LUIZ; DE OLIVEIRA *et al.*, 2020), necessitando assim de mais estudos que sanem tal controvérsia.

2.2 Ligadura embebida com bactérias (LIGbact)

Em 1988, pesquisa realizada em macacos introduziu *Pg* (anteriormente conhecido como *Bacteroides gingivalis*) na microbiota periodontal que resultou em um aumento nos níveis sistêmicos de anticorpos para o microrganismo e perda óssea rápida e significativa. Surgindo assim a possível hipótese de que as bactérias seriam capazes de iniciar a progressão da periodontite (HOLT; EBERSOLE; FELTON; BRUNSVOLD *et al.*, 1988).

Para investigar os efeitos bacterianos na periodontite novos animais passaram a ser utilizados, dentre eles os roedores, recentes estudos aplicaram esse modelo experimental em camundongos (KIMURA; NAGAI; ONITSUKA; KOGA *et al.*, 2000; KORAH; AMRI; BUGUENO; HOTTON *et al.*, 2020; LIN; BI; YU; KAWAI *et al.*, 2014).

O método da LIGbact, sendo a *Pg* mais utilizada, é capaz de ajudar na pesquisa de alternativas terapêuticas na prevenção da perda óssea periodontal (YUAN; GUPTE; ZELKHA; AMAR, 2011); assim como já tem sido aplicada também ao redor de implantes mostrando-se uma opção válida para o estudo da peri-implantite (DENG; HU; ZHOU; WANG et al., 2020).

A *Pg* é considerada um "patógeno-chave" e orquestra a inflamação através da manipulação da imunidade do hospedeiro e dos efeitos de toda a comunidade sobre a microbiota periodontal, essa alteração na homeostase é capaz de aumentar o processo inflamatório e a destruição óssea (DARVEAU; HAJISHENGALLIS; CURTIS, 2012; OLSEN; LAMBRIS; HAJISHENGALLIS, 2017).

Diante disso, com foco na *Pg*, apesar de não fazer parte da microbiota bacteriana dos camundongos; estudo de Kimura et al. (2000) mostrou que após 1 semana de infecção uma quantidade significativa dessa bactéria pode ser estabelecida na boca de 95% dos camundongos por meio de uma única infecção da ligadura aderida a *P. gingivalis* (LIG*Pg*); reduzindo essa taxa à 58% após 15 semanas da infecção (KIMURA; NAGAI; ONITSUKA; KOGA *et al.*, 2000).

Porém, apesar dessa redução de carga bacterina os camundongos infectados exibiram uma perda óssea alveolar gradativa até o final do experimento (13 a 15 semanas), sendo mais significativa nos animais que tiveram a indução da periodontite por ligadura com infecção em comparação com apenas ligadura (KIMURA; NAGAI; ONITSUKA; KOGA *et al.*, 2000). Li & Amar., (2007) também provaram efetividade do modelo afirmando que as ligaduras embebidas em patógenos acelera o processo e a perda óssea, podendo ser evidente em poucos dias (LI; AMAR, 2007).

Além dessa bactéria gram-negativa ser capaz de influenciar e exacerbar as respostas locais geradas através desse modelo de ligadura (LIN; BI; YU; KAWAI *et al.*, 2014) , o seu efeito sistêmico vem sendo pesquisado e inclusive comparado com outros modelos de indução (LAPÉRINE; CLOITRE; CAILLON; HUCK *et al.*, 2016; SAADI-THIERS; HUCK; SIMONIS; TILLY *et al.*, 2013). Alguns marcadores inflamatórios podem ser encontrados em níveis aumentados no sangue de animais submetidos a esse modelo (LIG*Pg*), resultando em uma periodontite mais ativa com resposta sistêmica (SAADI-THIERS; HUCK; SIMONIS; TILLY *et al.*, 2013).

Através desse tipo de modelo já é possível também estudar os efeitos de distúrbios/doenças sistêmicas no curso da periodontite. Amar et al. (2007) mostraram em camundongos que o quadro de obesidade é capaz de desregular o sistema imunológico alterando as respostas à infecção por *Pg*, além de aumentar a suscetibilidade a outras infecções bacterianas (AMAR; ZHOU; SHAIK-DASTHAGIRISAHEB; LEEMAN, 2007).

2.3 Gavagem oral (GAV)

Esse modelo consiste na inoculação de bactérias humanas vivas por meio de uma cânula oral-esofágica-gástrica ou uma micropipeta no sistema digestivo do animal, apresenta como vantagens administração via entérica de forma precisa e sem anestesia; tem sido usado na tentativa de reproduzir a inflamação periodontal e a perda óssea progressiva de forma crônica (BOYER; LEROYER; MALHERBE; FONG *et al.*, 2020; GARLET; CARDOSO; MARIANO; CLAUDINO *et al.*, 2010).

Apresenta como desvantagens a necessidade de múltiplas inoculações por um período de tempo maior (4-8 semanas) até o desenvolvimento da doença e presença de perda óssea significativa (HART; SHAFFER; AKILESH; BROWN *et al.*, 2004). Diante disso, tem sido abordado o estresse de contenção que esses animais experimentais são submetidos, mostrando que esse fator aumenta o risco de lesões esofágicas e pode influenciar no curso da periodontite sendo capaz de modular a resposta do hospedeiro acelerando a degradação dos tecidos periodontais e a perda óssea alveolar em ratos (NAKAJIMA; HAMADA; TAKAHASHI; SASAGURI *et al.*, 2006).

Dentre os animais escolhidos para esses modelos os camundongos são bastante utilizados, porém a sua espécie pode alterar os desfechos finais. Baker et al. (2000) mostraram que C57BL/6 do tipo selvagem são menos suscetíveis à perda óssea alveolar quando submetidos ao modelo de GAV, enquanto BALB/c são mais sensíveis (BAKER; DIXON; ROOPENIAN,

2000). Sugerindo assim, atenção dos pesquisadores na hora da escolha das espécies e analisar se ela responde o propósito do estudo.

Outro ponto que deve ser levado em consideração é o período de desafio microbiano estabelecido, apresentando divergências quanto à reabsorção óssea (DE MOLON; DE AVILA; BOAS NOGUEIRA; CHAVES DE SOUZA *et al.*, 2014). O maior número de inoculações por período resulta em perda óssea e quadro inflamatório mais acentuado tanto em nível local quanto sistêmico (PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019).

Um fator também influente na eficácia desse modelo é a escolha da espécie bacteriana e sua virulência, a *Pg* foi descrita desde 1994 e vem sendo o microrganismo de maior escolha devido a sua capacidade de alterar a quantidade e composição da microbiota oral, causando um estado disbiótico do microbioma oral em camundongos convencionais (HAJISHENGALLIS; DARVEAU; CURTIS, 2012). Hajishengallis et al.,(2011) pontuaram que níveis baixos desse patógeno pode não repercutir em uma perda óssea esperada (HAJISHENGALLIS; LIANG; PAYNE; HASHIM *et al.*, 2011), portanto seu uso na maioria dos estudos baseia-se em um grande tamanho de inóculo (10^9) de bactérias vivas (BAKER; EVANS; ROOPENIAN, 1994; DE MOLON; MASCARENHAS; DE AVILA; FINOTI *et al.*, 2016; LAPÉRINE; CLOITRE; CAILLON; HUCK *et al.*, 2016; PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019).

Ao optar por esse modelo deve-se atentar às cepas de *Pg* que diferem quanto a sua virulência e consequentemente apresentam diversos graus de patogenicidade sendo capazes de gerar diferentes desfechos imunoinflamatórios tanto locais como sistêmicos. (BAKER; DIXON; EVANS; ROOPENIAN, 2000; BOYER; LEROYER; MALHERBE; FONG *et al.*, 2020; WILENSKY; POLAK; AWAWDI; HALABI *et al.*, 2009).

Hajishengallis et al.,(2011) também retratam sobre a necessidade da presença de um microbioma nativo nesses animais para que ocorra uma ação combinada de *Pg* com outras bactérias; visto que essa quando inoculada em camundongos livres de germes não foi capaz de induzir a periodontite esperada (HAJISHENGALLIS; LIANG; PAYNE; HASHIM *et al.*, 2011). Diante disso, se a infecção for monomicrobiana ou polimicrobiana há possibilidade de também encontrar resultados conflitantes; observados em alguns estudos que ao associar *Fn* e *Pg* obtiveram um efeito potencializador na patogênese da periodontite (EBERSOLE; FEUILLE; KESAVALU; HOLT, 1997; POLAK; WILENSKY; SHAPIRA; HALABI *et al.*, 2009). Alguns estudos também mostraram uma reabsorção óssea ao associar com *A*a, apontando ser benéfico infecções bacterianas múltiplas nesse modelo (GAO; KANG; ZHANG; REZA

SAILANI *et al.*, 2020; KESAVALU; SATHISHKUMAR; BAKTHAVATCHALU; MATTHEWS *et al.*, 2007).

Em contradição observou que a monoinfecção de *Pg* apresenta resultados mais expressivos do que a infecção polimicrobiana (EBBERS; LÜBCKE; VOLZKE; KRIEBEL *et al.*, 2018), Ebbers et al.,(2018) ao compararem os efeitos desses microrganismos isoladamente observaram que a *Pg* provocou níveis superiores de perda óssea. Possível explicação para tais resultados seria que nesse tipo de infecção com duas ou mais bactérias patogênicas poderiam gerar uma competição (WRIGHT; BURNS; JACK; BACK *et al.*, 2013).

Entre todos os modelos de indução de periodontite, a gavagem tem apresentado maior potencial para ser escolhido quando se deseja estudar relações entre essa DP e doenças sistêmicas. Dados demonstram que a infecção oral por *Pg* induz alterações na produção sistêmica de citocinas que além de desempenhar um papel no desenvolvimento da periodontite, também provoca diversas alterações sistêmicas como disfunções endoteliais, exacerbação da inflamação gastrointestinal, acomete articulações; interfere no desenvolvimento de aterosclerose, agrava o quadro de colite, artrite reumatoide, entre outros (HAMAMOTO; OUHARA; MUNENAGA; SHOJI *et al.*, 2020; MIYAUCHI; MAEKAWA; AOKI; MIYAZAWA *et al.*, 2012; PARVANEH; WITTING; KU; MORADI *et al.*, 2021; TSUZUNO; TAKAHASHI; YAMADA-HARA; YOKOJI-TAKEUCHI *et al.*, 2021).

O desafio microbiano sistêmico e a inflamação resultante são capazes de causar bacteremia favorecendo a inflamação crônica e disbiose da microbiota intestinal (PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019; SLOCUM; KRAMER; GENCO, 2016), sendo considerado um novo mecanismo que liga a periodontite e doenças sistêmicas (SATO; YOKOJI; YAMADA; NAKAJIMA *et al.*, 2018). Alterações do microbioma intestinal conduzem uma resposta sistêmica que se engaja ativamente na modulação das respostas imunes periféricas, provocando alterações inflamatórias em vários tecidos e órgãos (OLSEN; YAMAZAKI, 2019).

Arimatsu et al. (2014) em seu estudo mostraram que administração oral de *Pg* além de induzir alteração na microbiota intestinal desses animais, também causa aumento da expressão gênica de citocinas inflamatórias no intestino e elevação do nível de endotoxinas séricas. Esses camundongos ao final do experimento acumularam maior gordura hepática, triglicerídeos e apresentaram resistência insulínica (ARIMATSU; YAMADA; MIYAZAWA; MINAGAWA *et al.*, 2014).

Diante do exposto, é possível dizer que esse é um modelo promissor que apresenta capacidade de responder diversas perguntas com relação a patogênese da periodontite. Porém, possui muitos fatores que podem influenciar o seu curso havendo a necessidade de atenção nas escolhas a serem feitas que vão desde a seleção dos animais, bactérias e cepas até o tempo experimental do estudo.

2.4 Injeção de bactérias (I-bact)

Inoculação periodontal de antígenos bacterianos isolados através de uma microinjeção composta de bactérias ou um componente do patógeno (por exemplo, lipopolissacarídeo- LPS) no tecido gengival vestibular ou palatino (LEIRA; IGLESIAS-REY; GÓMEZ-LADO; AGUIAR *et al.*, 2020). Apresenta como vantagem administração local de bactérias sendo considerado um método mais direto e controlado para a indução da periodontite, pois uma quantidade conhecida de estímulo inflamatório é fornecida de maneira titulável e constante (RAMAMURTHY; XU; BIRD; BAXTER *et al.*, 2002).

Esse modelo de periodontite experimental tem sido bem aceito, pois ele reproduz características clássicas da periodontite como presença de infiltrado inflamatório, edema da gengiva marginal e reabsorção do osso alveolar localizada que pode ser observada logo na primeira semana após o início das injeções bacterianas (DUMITRESCU; ABD-EL-ALEEM; MORALES-AZA; DONALDSON, 2004; MA; DAGNAES-HANSEN; LØVSCHALL; SONG *et al.*, 2015). É capaz de contornar o processo de colonização bacteriana permitindo um método mais simplificado de estudo dos mediadores inflamatórios dessa doença (HIYARI; ATTI; CAMARGO; ESKIN *et al.*, 2015).

O lipopolissacarídeo (LPS) é um componente crucial das membranas externas de todas as bactérias gram-negativas (RIETSCHEL; BRADE, 1992), provou ser o ativador do receptor da osteoclastogênese mediada pelo RANKL sendo considerado o primeiro componente bacteriano a demonstrar capacidade de induzir a reabsorção óssea in vitro (NAIR; MEGHJI; WILSON; REDDI *et al.*, 1996; ORCEL; FEUGA; BIELAKOFF; DE VERNEJOUL, 1993).

Pode também estimular células do hospedeiro incluindo fibroblastos gengivais, células fibroblásticas do ligamento periodontal, monócitos e macrófagos, além de produzir citocinas e mediadores locais como interleucina-1β (IL-1β), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- α) que resultam na degradação do tecido (REDDI; POOLE; NAIR; MEGHJI *et al.*, 1995; SISMEY-DURRANT; HOPPS, 1991; TOBIAS; GEGNER; TAPPING; ORR *et al.*, 1997). Há também estudos que mostram impactos sistêmicos em que a ativação da resposta

imune pode causar disfunção constante de órgãos vitais (NAIR; MEGHJI; WILSON; REDDI *et al.*, 1996; WANG; TONG; ZHANG; KHAN *et al.*, 2021).

Estudos recentes apontam que essa contribuição inflamatória causada pelo LPS pode estar ligada a doenças como aterosclerose (SUH; KIM; BOSTRÖM; WANG *et al.*, 2019), Alzheimer (SINGHRAO; OLSEN, 2018), artrite reumatoide (SCANU; GIRAUDO; GALUPPINI; LAZZARIN *et al.*, 2019) e são capazes também de provocar alterações na gravidez como: aumento da pressão arterial, proteinúria e até diminuição do peso fetal (MATA; NOBRE; FELIX SILVA; OLIEZER *et al.*, 2021). Além disso, o inverso também pode ocorrer, em que a presença de uma doença sistêmica afeta o curso da periodontite estabelecida por esse modelo; como podemos observar no estudo de Li,Y et al.,(2015) onde a presença da síndrome metabólica em camundongos levou a um aumento significativo da perda óssea comparado a camundongos saudáveis (LI; LU; ZHANG; YU *et al.*, 2015).

Porém, Ilievski et al. (2015) em seu estudo encontraram resultados controversos com baixos níveis plasmáticos de TNF-α, IL-1β e IL-6; não mostrando impacto inflamatório sistêmico em 18 semanas ao comparar grupo I-bact com controle (ILIEVSKI; CHO; KATWALA; RODRIGUEZ *et al.*, 2015). Esse modelo apresenta uma importante limitação que é a falta da reprodutibilidade da colonização bacteriana presente na periodontite humana, além da necessidade de injeções constantes ao longo do experimento. É muito comum nesse método fazerem uso de apenas uma bactéria para indução, não reproduzindo uma infecção periodontal fidedigna já que a evolução da periodontite não se deve a um único patógeno (HAJISHENGALLIS; LAMONT, 2021).

Dentre as bactérias mais escolhidas para indução destaca-se a *Pg*, o seu LPS é capaz de desencadear respostas inflamatórias nas células hospedeiras induzindo a produção de citocinas (JUNG; CHO; LEE; OH *et al.*, 2009). Recentemente, Kou et al.(2021) mostraram níveis aumentados de TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-18 em camundongos experimentais com periodontite e confirmaram respostas inflamatórias locais e sistêmicas no grupo de associação-LIGPg (KOU; JIANG; LIU; YANG *et al.*, 2021).

Em camundongos comprometidos sistemicamente, diabéticos, tratados com administrações repetidas de LPS*Pg* houve produção significativa de IL-6, TNF-α e TGF-β em seus glomérulos, diferente do observado em camundongos diabéticos não tratados com LPS ou não diabéticos administrados com LPS (SAWA; TAKATA; HATAKEYAMA; ISHIKAWA *et al.*, 2014).

Outra bactéria de escolha é *Aa*, sua aplicação tem mostrado eficiente tanto em ratos quanto camundongos, Nishida et al.,(2001) concluem que ela pode ser uma indutora mais

potente de reabsorção óssea do que a *Pg* mostrando efeitos em menor tempo (NISHIDA; HARA; KANEKO; IKEDA *et al.*, 2001), com 8 semanas já é possível observar perda óssea expressiva (ROGERS; LI; COATNEY; ROSSA *et al.*, 2007). No entanto, as respostas imunes e as reabsorções ósseas mostraram ser influenciadas de acordo com cada sorotipo da *Aa* em que o sorotipo b mostrou-se mais patogênico (MONASTERIO; CASTILLO; IBARRA; GUEVARA *et al.*, 2018).

Além da influência dos tipos de cepas bacterianas e a escolha da bactéria, a associação do modelo I-bact com outro método de indução como por exemplo: a LIG, também pode levar em outros resultados. Estudos mostraram um aumento na gravidade da periodontite quando há administração de bactérias em camundongos com LIG (AKKAOUI; YAMADA; DUARTE; HO *et al.*, 2020).

Porém, quando estudados de forma individual animais submetidos ao método I-bact apresentaram características inflamatórias diferentes da LIG, mostrando inflamações periodontais leves no início da indução que aumentaram gradativamente ao decorrer das semanas; o oposto pode ser observado no modelo LIG (DE AQUINO; GUIMARAES; STACH-MACHADO; DA SILVA *et al.*, 2009; WANG; TONG; ZHANG; KHAN *et al.*, 2021). Sugerindo que apesar da I-bact necessitar de mais tempo para induzir um estado inflamatório e perda óssea, ela possui tendência em aumentar com o tempo estabelecendo assim um possível quadro crônico (TAGUCHI; AONO; KAWATO; ASANO *et al.*, 2015).

Apesar de cada vez mais se associar o modelo de LIG a um quadro agudo, ainda é incerto os reais efeitos ao unir com outros métodos que induzem a periodontite por adição de bactérias, por exemplo: I-bact. Como pode ser observado em Mustafá et al.,(2021) que encontraram no grupo I-bact apenas inflamações leves não causando reabsorção óssea alveolar, e sua combinação com LIG teve efeitos insignificantes (MUSTAFA; CHENG; RADZI; FONG *et al.*, 2021).

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Levando em consideração todos os achados científicos ligados à progressão da perda óssea alveolar e ao papel da resposta imunoinflamatória na progressão da doença, o objetivo desta revisão sistemática é esclarecer e comparar os efeitos locais e sistêmicos de cada modelo de periodontite experimental em camundongos.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido de acordo com as recomendações do Enhancing the Enhancing the Quality and Transparency Of Health Research (rede EQUATOR), incluindo os Itens de Relatório Preferenciais para Revisões Sistemáticas e Meta-análises – PRISMA (PAGE; MCKENZIE; BOSSUYT; BOUTRON *et al.*, 2021); checklist apresentado no Anexo 1. A proposta foi registrada no The Open Science Framework Repo (https://osf.io/pbq7r/): DOI 10.17605/OSF.IO/PBQ7R.

Baseado no princípio PICO – a População: camundongos como modelo animal de periodontite induzida experimentalmente; a Intervenção e o Controle apropriado (ou comparador): diferentes métodos de indução de periodontite experimental em camundongos (por exemplo, inoculação oral, GAV, LIG ou combinação entre eles); os Desfechos de interesse: efeito local e sistêmico como: perda óssea alveolar, parâmetros/biomarcadores de inflamação local (tecido gengival) e sistêmica, confirmação de colonização bacteriana, análises histológicas, imuno-histoquímicas, imunofluorescência e imunocitoquímica da maxila - a seguinte questão focada foi proposta: “Quais são os efeitos locais e sistêmicos de diferentes métodos de indução de periodontite experimental em camundongos?”

Critérios de elegibilidade:

i. Critérios de inclusão: Estudos experimentais comparando os efeitos locais e/ou sistêmicos de duas ou mais técnicas/protocolos para a indução de periodontite experimental em camundongos.

ii. Critérios de exclusão: i. estudos de indução de periodontite em humanos ou outros modelos animais que não camundongos; ii. estudos que descrevem apenas um tipo de técnica/protocolo de indução de periodontite; iii. falta de confirmação de periodontite induzida experimentalmente, estudos de revisão e ausência de resultados de interesse; 4. estudos em que os resultados de interesse não estavam disponíveis para análise e os valores originais não puderam ser recuperados após contato com os autores originais; e v. indisponibilidade de cópia completa em papel.

iii. Foram incluídos apenas artigos em inglês, sem nenhuma restrição de dados.

Na primeira etapa, as referências cadastradas em todas as bases de dados foram importadas para o gerenciador de referências Rayyan para identificar as entradas duplicadas, descritas no fluxograma PRISMA (Figura 1). O processo de seleção foi realizado em duas fases: Fase 1, dois pesquisadores (Y.S.D.A. e C.H.) examinaram independentemente os títulos e resumos de

todas as referências identificadas, aplicando o processo de inclusão (processo cego); e etapa 2, os mesmos dois revisores aplicaram independentemente os critérios de exclusão aos demais estudos, com base na leitura do texto completo (processo cego). A confiabilidade entre revisores no processo de seleção dos estudos foi determinada pelo teste de Cohen κ, assumindo um valor limite aceitável de 0,8 (LANDIS; KOCH, 1977). A discordância em qualquer etapa foi resolvida por discussão e decisão mútua (reunião de consenso) com outros dois revisores (M.F.F. e D.B.P.B.). A decisão/seleção final foi sempre baseada no texto integral da publicação (Figura. 2). Autores de estudos não recuperados na íntegra foram contatados por e-mail em até cinco tentativas.

Foi realizada uma busca por estudos publicados até agosto de 2020 em diversas bases de dados eletrônicas, incluindo MEDLINE usando o mecanismo de busca PubMed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/pubmed), Scopus (http://www. scopus.com) e Embase (https://www.embase.com) através da Elsevier (https://www.elsevier.com), Web of Science – WOS (https://www.webofknowledge.com) acessado através do Clarivate Analytics (https://clarivate.com), Cochrane Library (https://www.cochranelibrary.com), LILACS e BBO (https://bvsalud.org). Utilizando vocabulário controlado (termos MeSH, Emtree e DeCS/MeSH) e termos livres combinados pelos operadores booleanos "OR" e "AND" (Anexo 2). Para manter a estratégia de busca atualizada, foram estabelecidos alertas para cada banco de dados.

Outras fontes foram acessadas por meio da consulta ao banco de dados Google Scholar (https://scholar.google.com.br), System for Information on Grey Literature in Europe (SIGLE) por meio do OpenGrey (www.opengrey.eu) e Open Science Framework – OSF (https://osf.io). As buscas manuais foram realizadas em revistas especializadas (Fig 1- etapa 1) Journal of Clinical Periodontology; Journal of Periodontal Research; Journal of Periodontology; Journal of Dental Research; Periodontology 2000; Clinical Oral Investigations; The Journal of the American Dental Association; e Journal of Dental Research; Odontologia) e nas listas de referências dos artigos selecionados (Fig 1- etapa 2). Não houve consulta ao banco de dados de registro para protocolo experimental utilizando animal.

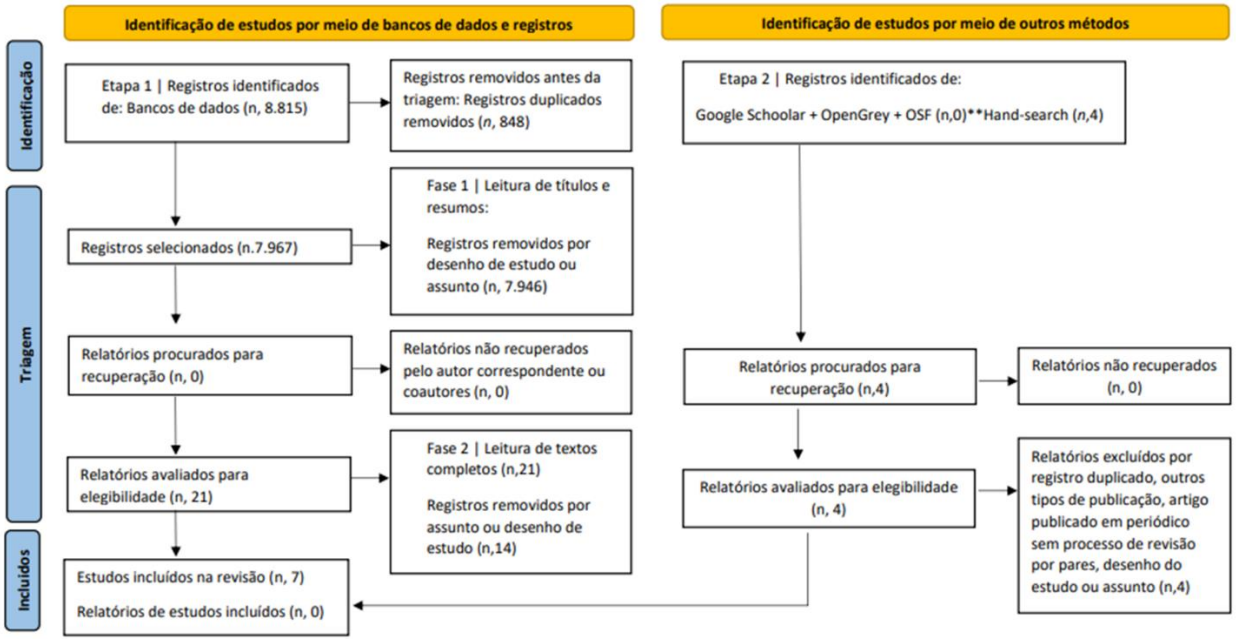
Os dados foram extraídos independentemente por dois revisores (Y.S.D.A. e C.H. [processo cego]) usando uma folha padronizada, conforme recomendado pelo manual da Colaboração Cochrane para revisão sistemática (Higgins et al. 2021); a precisão dos dados extraídos foi confirmada por outros autores (M.F.F. e D.B.P.B.). Dos artigos selecionados, foram extraídos os seguintes dados: Autor/Ano, modelo animal, periodontite experimental/tamanho da amostra,

intervenção, tempo de seguimento, método de diagnóstico, resultado (perda óssea alveolar) e desfechos secundários (tabela 1). Os resultados descritivos foram apresentados na forma de texto, figura e tabelas na ordem da estratégia PICO. A síntese dos resultados qualitativos seguiu a diretriz de relatórios SWiM (CAMPBELL; MCKENZIE; SOWDEN; KATIKIREDDI *et al.*, 2020).

Dados ausentes ou dados disponíveis apenas em gráficos foram recuperados por meio de contato com os autores correspondentes via e-mail e/ou redes sociais em até cinco tentativas. Em caso de não resposta, os dados disponíveis apenas em gráficos foram extraídos pelo programa WebPlotDigitizer® versão 4.4 (https://automeris.io/WebPlotDigitizer/), se necessário. Além disso, se dois ou mais estudos tivessem amostras sobrepostas e utilizassem metodologias semelhantes, o estudo mais completo era incluído.

A qualidade metodológica dos artigos incluídos nesta revisão foi avaliada por dois revisores (YSDA e CH) usando a ferramenta SYRCLE para estudos em animais (Systematic Review Center for Laboratory animal Experimentation) para avaliar o risco de viés (tabela 3) (HOOIJMANS; ROVERS; DE VRIES; LEENAARS *et al.*, 2014). Os seguintes itens foram avaliados: geração de sequência, características de linha de base, ocultação de alocação, alojamento aleatório, cegamento, avaliação de resultado aleatório, avaliador de resultado cego, dados de resultado incompletos, relatório de resultado seletivo e outras fontes de viés. Para cada domínio de viés, os estudos foram classificados como representando baixo, pouco claro ou alto risco de viés. Os estudos foram avaliados de forma independente por dois autores, e a concordância foi alcançada em reunião consensual com um terceiro (M.F.F.) e um quarto autor (D.B.P.B.), conforme necessário.

Figura 1. Fluxograma PRISMA para novas revisões sistemáticas, que incluiu buscas em bases de dados, registros e outras fontes do processo de triagem.



Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Seleção de estudos

Um total de 8.815 artigos potencialmente relevantes foram identificados por meio de busca nas bases de dados (Fig. 1), dos quais 848 foram excluídos após a remoção de duplicatas. Dos 7.967 estudos selecionados, 7.946 foram excluídos durante a leitura de títulos e resumos. Após a avaliação do texto completo das 21 publicações restantes, 14 estudos foram excluídos por assunto ou desenho de estudo, e sete estudos foram incluídos na revisão (Fig. 2).

Figura 2. Processo de seleção de estudos com base na avaliação do texto completo.

Processo de seleção (Fase 2)	Referências
Total de textos completos analisados (*n*, 21)	Barros et al. 2011; de Molon et al. 2013; de Molon et al. 2014; de Molon et al. 2016; Duan et al. 2016; Graves et al. 2008; Graves et al. 2012; Ideguchi et al. 2019; Kimura et al. 2000; Lapérine et al. 2016; Lin et al. 2017; Maekawa et al. 2014; Marchesan et al. 2018; Oz and Puleo, 2011; Palioto et al. 2019; Polak et al. 2010; Saadi-Thiers et al. 2013; Sulijaya et al. 2019; Sun et al. 2020; Yoneda et al. 2001; Zhuang et al. 2019
Excluídos (*n*, 14) [a] Estudos que descrevem apenas um tipo de técnica/protocolo de indução de periodontite [b] Estudos que foram uma revisão de literatura [c] Estudos que realizaram algum tipo de procedimento antes da indução da doença	Barros et al. 2011[a]; de Molon et al. 2013[b]; Graves et al. 2008[b]; Graves et al. 2012[b]; Ideguchi et al. 2019[c]; Kimura et al. 2000[a]; Maekawa et al. 2014[c]; Marchesan et al. 2018[a]; Oz and Puleo, 2011[b]; Polak et al. 2010[c]; Sulijaya et al. 2019[c]; Sun et al. 2020[c]; Yoneda et al. 2001[a]; Zhuang et al. 2019[c]
Incluídos (*n*, 7)	de Molon et al. 2014; de Molon et al. 2016; Duan et al. 2016; Lapérine et al. 2016; Lin et al. 2017; Palioto et al. 2019; Saadi-Thiers et al. 2013

5.2 Características dos estudos

As características dos estudos incluídos são apresentadas nas Tabelas 1 e 2. Dos sete estudos, seis foram realizados na linhagem C57BL/6 (DE MOLON; DE AVILA; BOAS NOGUEIRA; CHAVES DE SOUZA *et al.*, 2014; DE MOLON; MASCARENHAS; DE AVILA; FINOTI *et al.*, 2016; DUAN; GLEASON; LI; HOSUR *et al.*, 2016; LIN; HU; WANG; KAWAI *et al.*, 2017; PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019; SAADI-

THIERS; HUCK; SIMONIS; TILLY *et al.*, 2013) e 1 com camundongos CD1 Swiss (LAPÉRINE; CLOITRE; CAILLON; HUCK *et al.*, 2016). Todos os estudos compararam diferentes técnicas para induzir doença periodontal experimental, entre eles o número que tiveram grupos de LIG (n=7) (todos os estudos incluídos na revisão sistemática), LIG*Pg* (n=2) (LAPÉRINE; CLOITRE; CAILLON; HUCK *et al.*, 2016; SAADI-THIERS; HUCK; SIMONIS; TILLY *et al.*, 2013), GAV*Pg* (n=5) (DE MOLON; DE AVILA; BOAS NOGUEIRA; CHAVES DE SOUZA *et al.*, 2014; DE MOLON; MASCARENHAS; DE AVILA; FINOTI *et al.*, 2016; DUAN; GLEASON; LI; HOSUR *et al.*, 2016; PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019; SAADI-THIERS; HUCK; SIMONIS; TILLY *et al.*, 2013), GAVPgFn (n=2) (DE MOLON; DE AVILA; BOAS NOGUEIRA; CHAVES DE SOUZA *et al.*, 2014; DE MOLON; MASCARENHAS; DE AVILA; FINOTI *et al.*, 2016).

Um estudo realizou a combinação de dois modelos de indução de doença periodontal (GAV+ LIG) (PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019), de todos os estudos dois avaliaram o modelo de indução I-bact (DE MOLON; DE AVILA; BOAS NOGUEIRA; CHAVES DE SOUZA *et al.*, 2014; LIN; HU; WANG; KAWAI *et al.*, 2017).

Todos os estudos realizaram indução de periodontite por ligadura circundante no primeiro molar superior (n=4), com exceção de três estudos em que a indução foi realizada no segundo molar superior (DUAN; GLEASON; LI; HOSUR *et al.*, 2016; LIN; HU; WANG; KAWAI *et al.*, 2017; PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019).

Ao observar os desenhos experimentais, três estudos analisaram apenas em um tempo: em 60 dias (PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019), 42 dias (DUAN; GLEASON; LI; HOSUR *et al.*, 2016) e 14 dias (LIN; HU; WANG; KAWAI *et al.*, 2017). Os outros estudos avaliaram em mais de um período; de Molon et al, 2016 (45 e 60 dias); Lapérine et al., 2016 (4,14 e 28 dias); de Molon et al., 2014 (7,15 e 30 dias) e Saadi et al.,2013 (15,45 e 67 dias).

Tabela 1. Resumo das características dos estudos com animais incluídos.

Autor/ Ano	Modelos de animais/ Idade	Grupos de comparação	Intervenção	Tempo	Méto-dos de análises	Resulta-dos perda óssea alveolar	Resultados Secundários
Palioto et al., 2019	C57BL/6 machos 6 a 8 semanas	Controle (Sham) n=5 Ligadura (LIG) n=5 (Lig 5 dias) Pg gavagem (GAVPg) n=5 Combinação dois modelos (LIG+GAV) n=5	Ligaduras de seda 5.0 ao redor dos segundos molares superiores foram colocadas por 5 dias. Inoculação oral de 10^9 P. gingivalis (ATCC 33277) Após 5 dias, a ligadura foi removida e os animais foram inoculados com Pg.	60 dias	µCT	Verificou-se que a perda óssea alveolar foi maior na gavagem e no modelo combinado.	**Imunoensaio multiplex** grupos LIG e GAV induziram mediadores inflamatórios séricos significativa mente maiores, em contraste com LIG+GAV, que foi menor. **Imunofluo-rescência.** Um maior número de mediadores inflamatórios e epigenéticos foi observado no periodonto do grupo GAV e LIG + GAV do que no grupo LIG isolado. No intestino: GAV maior número desses marcadores em comparação com LIG e LIG+GAV

Lin M et al., 2017	C57BL/6J - WT - TLR2(KO) - TLR4(KO) -TLR2 &4KO 8 a10 semanas	Controle Injeção de bactérias (I-bact) Ligadura (LIG)	10 µL de *P. gingivalis* ATCC 33277 vivo (1 × 10^{10}UFC/mL em PBS) no sulco dos 2° molares superiores. Por 4 dias consecutivos após a infecção inicial Ligaduras de seda 7.0 ao redor dos 2°molares superiores, em ambos os lados, por 2 semanas	14 dias	µCT	O grupo LIG revelou perda óssea significativamente maior em todos os tipos de camundongos em comparação ao controle. O grupo de infecção por *P. gingivalis* teve perda óssea significativamente maior em comparação com o grupo controle WT e TLR2 KO, mas nem todos os grupos eram dependentes de TLR4.	**PCR em tempo real e ensaio ELISA** O aumento da expressão de RNAm e proteína de RANKL induzido por P. gingivalis foi diminuído quando ambos TLR2 e TLR4 estavam ausentes. Além disso, o aumento induzido pela ligação da expressão da proteína RANKL foi independente de TLR2 e TLR4.
Lapérine O et al., 2016	CD1 Swiss machos com 12 semanas (n=90)	Ligadura embebida em *P. gingivalis* (LIG*Pg*) Ligadura (LIG) Ligadura (sham)	Ligadura de seda 6.0 com *Pg* (ATCC 33277) 10^9 UFC/mL Ligadura seda 6.0 ao redor 1° molar superior, procedimento repetido 2x/semana Incisão no epitélio sulcular	4, 14 e 28 dias	µCT	LIG*Pg* induziu perda óssea alveolar que persistiu até 28 dias, LIG por si só não alcançou o mesmo resultado.	**Imunohisto-química (IHC)** **RT-qPCR** **ELISA** LIG e LIG*Pg* apresentaram níveis elevados de IL-33 aos 4 e 14 dias, mas para a expressão contínua (aos 28 dias) este aumento significativo foi mantido apenas no grupo LIG*Pg*.

de Molon RS et al., 2016	C57BL/6J fêmeas com 8 semanas de idade n=48	Ligadura (LIG) *P. gingivalis*-gavagem. (GAV) *Pg* com *F. nucleatum* - gavagem. (GAV*PgFn*) Controle	Ligadura nylon 6.0 ao redor 1°molar superior (ambos os lados) Inoculação de 1×10^9 UFC de *P. gingivalis* (ATCC 33277) 100 µL de bactéria (50 µL of 1×10^9 UFC/mL de *P. gingivalis* (ATCC 33277) e 50 µL of 1×10^9 UFC of *F. nucleatum* (ATCC 25586)	45 e 60 dias	µCT	Todos os grupos apresenta-ram arquitetura óssea normal com exceção do grupo LIG	**Análise estereomé-trica** Apenas o grupo LIG apresentou diminuição significativa de fibroblastos e aumento significativo de células inflamatórias aos 45 e 60 dias em relação aos demais grupos. **Análise histométrica** Infiltrado inflamatório e reabsorção do osso interproximal foi observado apenas no grupo LIG
Duan X et al., 2016	C57/BL6 Com 8-10 semanas. Fêmeas e machos	*P. gingivalis*-gavagem (GAV) (fêmeas) (machos) Ligadura (LIG) (fêmeas) (machos) Controle gavagem (CONTGAV)	10^9 UFC P. gingivalis (ATCC 33277) Ligadura seda 5.0 ao redor do segundo molar superior. A perda óssea alveolar foi examinada 7 dias depois	42 dias	Micros cópio de dissec-ção	As fêmeas desenvolve -ram mais perda óssea do que os camundon-gos machos no modelo GAV, embora não significa-tiva. Camundon-gos fêmeas são mais suscetíveis à perda óssea no modelo LIG.	**Análise de q-PCR** A infecção GAV causa um baixo nível de inflamação e não apresentou diferença significativa entre os sexos, mas no LIG houve maior presença de citocinas e proteínas pró inflamatórias no sexo feminino resultando em periodontite mais grave.

de Molon RS et al., 2014	C57BL/6 fêmeas 8 semanas n=108	Controle (CONT) Ligadura (LIG) *P.gingivalis*-gavagem (GAV*Pg*) *P.gingivalis* com *F.nucleatum* gavagem (GAV*PgFn*) Injeção de bactérias (I-bact) Solução salina tamponada com fosfato injetada na mucosa palatina	Ligadura nylon 6.0 ao redor 1° molar superior Inoculação oral de 1 × 10^9 UFC de *Pg* (ATCC 33277) na cavidade oral com micropipeta *Pg* (1 × 10^9 UFC/ mL) foi misturado com volume igual de *Fn* (ATCC 25586) 0.5 µL 1 × 10^{10} UFC/mL diluída em PBS.	7,15 e 30 dias	µCT	Perda óssea alveolar foi observada no modelo LIG nos dias 7 e 15, com diminuição na intensidade da perda óssea durante o período de 30 dias, enquanto no modelo de i-Pg a partir do dia 15 houve perda significa-tiva que continuou a progresso ao longo do tempo	**Análises Histológicas** O modelo LIG por 7, 15 e 30 dias induziu uma resposta inflamatória com intensa infiltração de células inflamatórias, perda de inserção do CT (AL) e reabsorção óssea alveolar. O modelo de i-Pg apresentou um aumento do influxo de células inflamatórias e perda óssea alveolar a partir do dia 15. **Análises quantitativas da expressão de mRNA** Todas as citocinas foram mais pronunciadas no modelo LIG com redução no dia 15. No grupo modelo i-Pg esse aumento foi visível durante o período de 15 dias, mas sem diferença significativa entre os grupos.

Saadi-Thiers K et al., 2013	C57BL/6J machos de 6 a 12 semanas n=50	Ligadura (LIG) (15 dias) (45 dias) Ligadura embebida em *P. gingivalis* (LIG*Pg*) (15dias) (30 dias) *P.gingivalis*-gavagem. (GAVtest) (GAVcontrol) Controle (15 dias) (45 dias)	Ligadura seda 6.0 ao redor do 1°molar superior em ambos lados, substituídas 2x/semana Fios de seda 6.0 incubados em meio de cultura contendo Pg ATCC 33277 em câmara anaeróbica por 1 dia; substituídas 2x/semana. Inoculação de 10^9 UFC Pg suspenso em 100 µL de PBS contendo 2% de carboximetil-celulose.	15, 45 e 67 dias.	Análise Histo-morfomé-trica e ensaio TRAP de osteoclas-to.	A perda óssea alveolar foi aumentada em LIG*Pg*15 em compara-ção com LIG15, mas foi significati-vamente maior em compara-ção com CONTROL 15, GAVtest e GAVcontrol. As células osteoclás-ticas foram mais numerosas no grupo LIG*Pg*15 do que no grupo LIG15.	**Exame clínico e histológico.** Decresci-mento epitelial significativo observado em LIG*Pg*15 e LIG15 em comparação com CONT15, GAVtest e GAVcontrol. **Níveis de citocinas no sangue** A quantidade de IL-6 foi duas vezes mais elevada em camundongos LIG*Pg* em comparação com outros grupos.

Tabela 2. Métodos de análises usadas nos estudos

Métodos de análises usadas nos estudos	Palioto et al., 2019	Lin et al., 2017	Laperine O et al., 2016	de Molon RS et al., 2016	Duan X et al., 2016	de Molon RS et al., 2014	Saadi-Thiers K et al., 2013
Perda óssea alveolar (micro-ct)	+	- *	+	+ In vivo	- **	+	- ***
Níveis de citosinas no soro	+	-	+	-	-	-	+
PCR(confirmação colonização bacteriana)	-	-	-	+	+	-	-
PCR tecido gengival (biomarcadores inflamatórios)	-	+	+	-	+	+	-
ELISA Tecido gengival	-	+	-	-	-	-	-
Imunohistoquímica Maxila	-	-	+	-	+	-	-
Análise Histológica Maxila	-	-	-	+	-	+	+
Imunofluorescência Tecido intestino	+	-	-	-	-	-	-
Imunofluorescência Maxila	+	-	-	-	-	-	-
Imunocitoquímica	-	-	-	-	-	-	+

In vivo: análise feita com os animais experimentais vivos

***** Análise perda óssea alveolar feita por estereomicroscopia digital

****** Análise perda óssea alveolar feita por microscópio de dissecção

******* Análise perda óssea alveolar feita por histomorfometria

Com relação aos métodos de análise utilizados, apenas dois estudos confirmaram a colonização bacteriana por PCR (DE MOLON; MASCARENHAS; DE AVILA; FINOTI *et al.*, 2016; DUAN; GLEASON; LI; HOSUR *et al.*, 2016), os demais não confirmaram isso por nenhum outro método; para comprovar que a periodontite foi estabelecida, todos os artigos (n=7) avaliaram a perda óssea alveolar por microtomografia computadorizada (µCT).

Quanto a análise de resultados inflamatórios locais no tecido gengival, biomarcadores inflamatórios foram analisados por PCR em 4 artigos (DE MOLON; DE AVILA; BOAS NOGUEIRA; CHAVES DE SOUZA *et al.*, 2014; DUAN; GLEASON; LI; HOSUR *et al.*, 2016; LAPÉRINE; CLOITRE; CAILLON; HUCK *et al.*, 2016; LIN; HU; WANG; KAWAI *et al.*, 2017), o método ELISA foi usado apenas por Lin et al. (2017). Na maxila, foram realizadas análises histológicas (n=3) (SAADI-THIERS; HUCK; SIMONIS; TILLY et al., 2013; DE MOLON; DE AVILA; BOAS NOGUEIRA; CHAVES DE SOUZA et al., 2014; DE MOLON; MASCARENHAS; DE AVILA; FINOTI et al., 2016) e imuno-histoquímica (n=2) (DUAN; GLEASON; LI; HOSUR et al., 2016; LAPÉRINE; CLOITRE; CAILLON; HUCK et al., 2016). Os resultados inflamatórios sistêmicos foram analisados no soro (n= 3) (LAPÉRINE; CLOITRE; CAILLON; HUCK *et al.*, 2016; PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019; SAADI-THIERS; HUCK; SIMONIS; TILLY *et al.*, 2013) e intestino (PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019). Todas essas informações podem ser encontradas na tabela 2.

5.3 Periodontite induzida experimentalmente

Todos os estudos selecionados compararam os efeitos locais e/ou sistêmicos de duas ou mais técnicas/protocolos para a indução de periodontite experimental em camundongos da linhagem C57BL/6 (n, 6) (DE MOLON; DE AVILA; BOAS NOGUEIRA; CHAVES DE SOUZA *et al.*, 2014; DE MOLON; MASCARENHAS; DE AVILA; FINOTI *et al.*, 2016; DUAN; GLEASON; LI; HOSUR *et al.*, 2016; LIN; HU; WANG; KAWAI *et al.*, 2017; PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019; SAADI-THIERS; HUCK; SIMONIS; TILLY *et al.*, 2013) ou camundongos CD1 Swiss (n, 1) (LAPÉRINE; CLOITRE; CAILLON; HUCK *et al.*, 2016). As técnicas/protocolos para a indução de periodontite experimental descritas nos estudos incluem a técnica GAV com duas espécies bacterianas Pg ATCC 33277 e Fusobacterium nucleatum (Fn) -Fn ATCC 25586 (DE MOLON; DE AVILA; BOAS NOGUEIRA; CHAVES DE SOUZA *et al.*, 2014; DE MOLON; MASCARENHAS; DE

AVILA; FINOTI *et al.*, 2016), um estudo realizou a combinação de LIG + GAV (PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019), e dois estudos utilizaram a administração da bactéria Pg ATCC 33277 na mucosa palatina (I-bact) (DE MOLON; DE AVILA; BOAS NOGUEIRA; CHAVES DE SOUZA *et al.*, 2014; LIN; HU; WANG; KAWAI *et al.*, 2017). Todos estudos usaram em suas diferentes formas a bactérias Pg ATCC 33277.

A colocação de LIG para retenção de biofilme local variou entre o primeiro molar superior (n=4) com exceções de Duan et al. (2016), Lin et al.,(2017) e Palioto et al.,(2019) que colocaram no segundo molar (DUAN; GLEASON; LI; HOSUR *et al.*, 2016; LIN; HU; WANG; KAWAI *et al.*, 2017; PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019).

Em relação ao tempo experimental os maiores foram 67 (SAADI-THIERS; HUCK; SIMONIS; TILLY *et al.*, 2013) e 60 dias (PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019), porém Saadi et al.,(2013) comparou os desfechos em mais dois tempos (15 e 45 dias). Lin et al. (2017) foi o estudo que fez uma única avaliação no menor tempo (14 dias), diferente de Duan et al.,(2016) que escolheu um tempo maior para avaliar a periodontite (42 dias).Os demais estudos escolheram 3 períodos sendo eles mais curtos, médio e longos: 7,15 e 30 dias (DE MOLON; DE AVILA; BOAS NOGUEIRA; CHAVES DE SOUZA *et al.*, 2014) e Lapérine et al.,(2016) em 4,14 e 28 dias.

5.4 Confirmação de colonização bacteriana

A colonização bacteriana local após a indução de periodontite foi confirmada por PCR em tecido gengival (DE MOLON; MASCARENHAS; DE AVILA; FINOTI *et al.*, 2016) e amostras de biofilme (DUAN; GLEASON; LI; HOSUR *et al.*, 2016). No estudo de Duan et al. 2016, a contagem de bactérias orais antes do LIG foi muito semelhante à presença de periodontite induzida experimentalmente. Sete dias após LIG, as fêmeas apresentaram carga bacteriana significativamente maior do que os machos; esses dados não foram apresentados para o grupo GAV*Pg*. De Molon et al., 2016 avaliaram a presença de bactérias periodontopatogênicas em todos os grupos (controle, LIG, GAV*Pg*, GAV*PgFn*). O DNA genômico de periodontopatógenos não foi identificado no grupo controle (CONT). Os grupos LIG e GAV*Pg* apresentaram aumentos semelhantes no número de cópias do gene em ambos os períodos 45 e 60 dias após a indução da periodontite, e níveis mais elevados do que no grupo GAV*PgFn* aos 60 dias.

5.5 Análise de perda óssea alveolar

A análise da perda óssea alveolar foi realizada usando microtomografia computadorizada (μCT) na maioria dos estudos (n=4) (DE MOLON; DE AVILA; BOAS NOGUEIRA; CHAVES DE SOUZA *et al.*, 2014; DE MOLON; MASCARENHAS; DE AVILA; FINOTI *et al.*, 2016; LAPÉRINE; CLOITRE; CAILLON; HUCK *et al.*, 2016; PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019), sendo possível obter resultados bidimensionais: da junção-cemento-esmalte (JCE) até a crista óssea alveolar (COA) e tridimensionais: volume ósseo de uma região de interesse que diferiu de acordo com cada estudo. Nos estudos restantes esses dados foram obtidos por estereomicroscopia digital (LIN; HU; WANG; KAWAI *et al.*, 2017), microscópio de dissecação (DUAN; GLEASON; LI; HOSUR *et al.*, 2016) e ensaio de histomorfometria. (SAADI-THIERS; HUCK; SIMONIS; TILLY *et al.*, 2013). Apresentaram apenas resultados bidimensionais (lineares) medidos da JCE até a COA.

Foi possível observar após as análises que na maioria dos estudos foram significativas as perdas ósseas nos períodos iniciais da indução no grupo LIG, com exceção de Lapérine et al. (2016) que não induziu perda óssea significativa comparado ao grupo CONT-LIG. Outra observação importante quanto a avalição das reabsorções ósseas nesses estudos foi a tendência de cronificação desse processo quando adicionado algum desafio bacteriano, que pode ser visto através dos grupos LIG*Pg* (LAPÉRINE; CLOITRE; CAILLON; HUCK *et al.*, 2016; SAADI-THIERS; HUCK; SIMONIS; TILLY *et al.*, 2013), no grupo injeção de Pg (i-*Pg*)(DE MOLON; DE AVILA; BOAS NOGUEIRA; CHAVES DE SOUZA *et al.*, 2014), em indução por gavagem (PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019). Em contradição de Molon et al., (2016) foi o único que não encontrou reabsorção óssea por GAV em um maior tempo experimental (45 dias).

5.6 Análise da inflamação do tecido gengival

Três estudos avaliaram a inflamação local pelo método de PCR (DE MOLON; DE AVILA; BOAS NOGUEIRA; CHAVES DE SOUZA *et al.*, 2014; DUAN; GLEASON; LI; HOSUR *et al.*, 2016; LIN; HU; WANG; KAWAI *et al.*, 2017) dentre eles um estudo avaliou o nível de expressão de RANKL também por ELISA (LIN; HU; WANG; KAWAI *et al.*, 2017). Os biomarcadores avaliados em cada estudo estão resumidos na Fig. 3.

Figura 3. Biomarcadores inflamatórios por estudo.

Biomarcadores	Referências
IL1β, IL6, RANKL, OPG	de Molon et al. 2014
IL1β, IL6, IL10, IL17, TNFα, TGFβ	Duan et al. 2016
IL1β, IL10, TNFα e RANKL(ELISA e PCR)	Lin et al. 2017

Nota de rodapé: IL-1β, interleucina 1 beta; IL-6, interleucina 6; IL-10, interleucina 10; IL-17, interleucina 17; TNFα, fator de necrose tumoral alfa; TGFβ, fator de crescimento transformador beta; RANKL, ativador do receptor do ligante beta do fator nuclear kappa; OPG, osteoprotegerina.

Foi possível notar em de Molon et al. (2014) que o comportamento dos marcadores (IL-6, IL-1β, RANKL e OPG) mudam dentro do mesmo grupo experimental em tempos de indução diferentes, no caso do grupo LIG em que todos os marcadores eram mais visíveis aos 7 dias com redução significativa 15 dias após a indução. No grupo com infecção por *Pg* houve tendência de todos os biomarcadores aumentarem em 15 dias; todo o estudo foi realizado em camundongos da mesma cepa (C57BL/6) (DE MOLON; DE AVILA; BOAS NOGUEIRA; CHAVES DE SOUZA *et al.*, 2014).

Em Lin et al. (2017) que compararam os grupos: CONT, infecção por Pg viva (injetada no sulco gengival) e LIG; em 4 linhagens de camundongos: WT, TLR2&4KO, TLR2(KO) e TLR4(KO) analisando seus resultados observamos que cada biomarcador pode ser capaz de se expressar de formas diferentes no mesmo tipo do modelo de indução. No caso do grupo *Pg*, o marcador IL-10 foi significativamente maior nos camundongos WT em relação ao CONT, mas o mesmo não ocorreu com TNF-α e IL-1β, que não obtiveram diferenças significativas em relação ao grupo CONT para qualquer um dos 4 tipos de camundongos (LIN; HU; WANG; KAWAI *et al.*, 2017).

Ao verificar dentro do grupo LIG a citocina IL-1β foi a mais expressiva em relação ao grupo CONT para os 4 tipos de animais, enquanto o contrário ocorreu com o TNF-α. No entanto, a IL-10, apesar de não ser significativa em 3 tipos de camundongos: WT, TLR2(KO) e TLR4(KO), apresentou níveis significativamente mais baixos em TLR2 e 4KO (LIN; HU; WANG; KAWAI *et al.*, 2017).

Também foi possível notar neste estudo que um único biomarcador pode apresentar diferentes comportamentos ao comparar diferentes modelos de indução, por exemplo IL-1β, que após a indução da periodontite por LIG apresentou níveis significativamente maiores em

relação ao grupo CONT para os 4 tipos de camundongos. No entanto, no grupo de infecção por *Pg* os resultados não mostraram diferenças significativas para nenhum tipo de camundongo.

Quando a proteína RANKL (ELISA) foi analisada, ela também se comportou de forma diferente, dependendo do tipo de cada animal e do modelo de indução: na periodontite induzida por *Pg*, sua expressão foi menor na ausência de TLR2 e TLR4, mas em LIG houve foi uma expressão maior sendo independente de TLR2 e TLR4. No método de análise de mRNA (qPCR), seus níveis foram significativamente maiores nos 2 modelos, em comparação com o CONT para alguns tipos de camundongos (LIN; HU; WANG; KAWAI *et al.*, 2017).

Além disso, o sexo dos camundongos C57BL/6 também pode interferir na expressão de marcadores inflamatórios ou anti-inflamatórios como IL-1β, IL-6, IL-10, IL-17, TNF-α e TGF-β. Dentre estes, IL-17, IL-1β e IL-6 foram maiores no sexo feminino em relação ao masculino e TNF-α, TGF-β e IL-10 não apresentaram diferenças significativas entre os sexos no modelo LIG. No modelo experimental de GAV, foram encontrados baixos níveis de expressão desses marcadores, não induzindo diferença estatística entre os sexos (DUAN; GLEASON; LI; HOSUR *et al.*, 2016).

5.7 Análise histológica

Análises histológicas complementares foram realizadas por dois estudos (DE MOLON; DE AVILA; BOAS NOGUEIRA; CHAVES DE SOUZA *et al.*, 2014; DE MOLON; MASCARENHAS; DE AVILA; FINOTI *et al.*, 2016) com o objetivo de avaliar, respectivamente, a presença de infiltrados inflamatórios em diferentes regiões da maxila e o grau de reabsorção óssea.

Em de Molon et al. (2014) diferenças significativas na inflamação do tecido gengival foram relatadas aos 7, 15 e 30 dias após a indução da periodontite por LIG, enquanto no modelo I-bact a inflamação local foi evidente a partir do dia 15 e persistiu ao longo do tempo. No entanto, de Molon et al. (2016) não observaram inflamação ou reabsorção óssea alveolar 45 e 60 dias após a indução da periodontite em ambos os grupos GAV*Pg* e GAV*PgFn*, diferentemente dos efeitos locais do LIG representados pelo aumento do infiltrado inflamatório e aumento da distância da junção cemento-esmalte.

Saadi et al. (2013) avaliaram a reabsorção óssea por histomorfometria. Os autores relataram um aumento no número de células osteoclásticas no grupo LIGPg15 e LIG15 dias após a intervenção, em comparação com os grupos CONT, GAVTEST e GAVCONT. Além

disso, a perda óssea foi dependente do tempo sendo mais pronunciada em camundongos LIG do que LIGPg.

5.8 Análise imunohistoquímica

A expressão local de citocinas devido à periodontite foi avaliada por imuno-histoquímica em dois estudos (DUAN; GLEASON; LI; HOSUR *et al.*, 2016; LAPÉRINE; CLOITRE; CAILLON; HUCK *et al.*, 2016). Duan et al., 2016 realizaram experimentos histoquímicos após a discrepância encontrada por PCR na expressão de IL-17A em relação a outras citocinas. Assim, eles procuraram atividades de IL-17A, IL-1β e IL-6 em tecidos gengivais em camundongos do grupo LIG em comparação com o grupo CONT (sem LIG) (DUAN; GLEASON; LI; HOSUR *et al.*, 2016).

Como esperado, houve confirmação de que IL-17A é a proteína que mais expressa e seus níveis foram maiores em camundongos fêmeas do que em camundongos machos. As outras duas citocinas (IL-1β e IL-6) também foram elevadas após o estabelecimento do LIG periodontal em relação ao CONT, mas não houve diferença significativa entre os gêneros (DUAN; GLEASON; LI; HOSUR *et al.*, 2016).

O outro estudo apenas avaliou a presença de IL-33 em que este marcador estava elevado após a indução da periodontite em ambos os grupos LIG e LIG*Pg* em relação ao LIG-CONT, mas este nível permaneceu elevado por mais tempo (28 dias) no grupo LIG*Pg* em comparação com o grupo LIG (LAPÉRINE; CLOITRE; CAILLON; HUCK *et al.*, 2016).

5.9 Análise de imunofluorescência e imunocitoquímica

A atividade celular em amostras maxilares foi avaliada em camundongos C57BL/6 por imunofluorescência (PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019) e imunocitoquímica (SAADI-THIERS; HUCK; SIMONIS; TILLY *et al.*, 2013). No primeiro estudo, foi realizada imunofluorescência para analisar marcadores epigenéticos (DNMT3b) e inflamatórios (BTLA e IL-18R1), todos encontrados em maior quantidade no grupo que associou LIG + GAV e no grupo com apenas GAV em comparação com o grupo LIG sozinho (PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019).

No outro estudo, a partir de 3 grupos experimentais (GAV, LIG e LIG*Pg*) e 2 grupos CONT (LIG-CONT e GAV-CONT) avaliaram a expressão de CATB e MMP-9. Em relação ao CATB, este não foi detectado no grupo LIG15, 15 dias após a colocação da ligadura, mas foi expresso no mesmo período de tempo no grupo em que foi adicionado *Pg* (LIG*Pg*15); no grupo

GAV este marcador foi detectado em apenas algumas células (SAADI-THIERS; HUCK; SIMONIS; TILLY *et al.*, 2013).

A MMP-9 foi detectada principalmente em células do tecido conjuntivo e do ligamento periodontal nos grupos LIG15 e LIG*Pg*30, mas pode ser encontrada em leucócitos e osteoclastos em todos os modelos experimentais. Uma nota sobre a análise imunocitoquímica deste estudo: parece que seu objetivo era apenas descrever os efeitos ou confirmar a eficácia dos modelos para induzir periodontite em camundongos sem dados estatísticos comparando os modelos (SAADI-THIERS; HUCK; SIMONIS; TILLY *et al.*, 2013).

5.10 Análise da inflamação sistêmica

Lapérine et al. (2016), Palioto et al. (2019) e Saadi-Thiers et al. (2013) investigaram o impacto sistêmico da periodontite. Os níveis séricos de citocinas e outros marcadores imunoinflamatórios foram avaliados em cada estudo, tais como: fator de ativação de células B (BAFF), proteína 10 induzida por interferon gama (IP-10), regulada na ativação, células T normais expressas e secretadas (RANTES), ativador do receptor de ligante beta do fator nuclear kappa (RANKL) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 beta (IL-1β) (SAADI-THIERS; HUCK; SIMONIS; TILLY *et al.*, 2013) e interleucina 33 (IL-33) (LAPÉRINE; CLOITRE; CAILLON; HUCK *et al.*, 2016). Além disso, Palioto et al. (2019) avaliaram por imunofluorescência a expressão de proteínas inflamatórias como atenuador de linfócitos B e T (BTLA) e receptor 1 de interleucina 18 (IL-18R1) no intestino.

O modelo de indução de GAV levou a uma maior expressão de BTLA e IL-18R1 no intestino em comparação com os grupos LIG e LIG+GAV. No soro, tanto LIG como GAV aumentaram significativamente os níveis séricos dos biomarcadores BAFF, IL-10, RANTES, RANKL e VEGF. No entanto, a associação de LIG+GAV resultou em níveis séricos mais baixos desses marcadores em comparação com os métodos usados isoladamente (PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019).

Saadi-Thiers et al. (2013) relataram níveis séricos duas vezes mais elevados de IL-6 no grupo (LIG*Pg*) em comparação com LIG e GAV. No entanto, os autores observaram redução na concentração dessa citocina durante o experimento, exceto no grupo LIG, no qual houve aumento significativo ao longo do tempo. Nesse mesmo estudo, outra citocina inflamatória (IL-β) se comportou de forma oposta, aumentando seus níveis ao longo do tempo (15 a 30 dias) no

modelo LIG*Pg* e diminuindo no grupo LIG (15 a 45 dias) (SAADI-THIERS; HUCK; SIMONIS; TILLY *et al.*, 2013).

Lapérine et al. (2016) realizaram a indução de periodontite através de 2 grupos experimentais LIG*Pg*, LIG e para LIGCONT, a análise realizada por ELISA não encontrou aumento na concentração sérica de IL-33 em nenhum dos grupos; sugerindo que talvez essa citocina não esteja envolvida em um processo inflamatório sistêmico (LAPÉRINE; CLOITRE; CAILLON; HUCK *et al.*, 2016).

5.11 Análise de risco de viés

Ao analisar os 10 itens necessários para a análise de riscos de viés (tabela 3), em três itens: “sequence generation”, “selective outcome reporting” e “other sources of bias”, todos os artigos incluídos na revisão (n=7) apresentaram baixo risco; o contrário pode ser observado nos itens: “blinding” e “random outcome assessment” onde todos os artigos apontaram alto risco. O tópico “allocation concealment” foi o que apresentou os riscos mais incertos (n=5) (DUAN; GLEASON; LI; HOSUR *et al.*, 2016; LAPÉRINE; CLOITRE; CAILLON; HUCK *et al.*, 2016; LIN; HU; WANG; KAWAI *et al.*, 2017; PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019; SAADI-THIERS; HUCK; SIMONIS; TILLY *et al.*, 2013); as “baseline characteristics” mostraram principalmente baixo risco (n = 5) e apenas dois artigos não apresentaram risco claro (PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019; SAADI-THIERS; HUCK; SIMONIS; TILLY *et al.*, 2013).

Em relação aos itens “random housing” e “incomplete outcome data”, apenas Duan et al. (2016) apresentou riscos elevados para ambos os itens e Palioto et al. (2019) riscos pouco claros; os demais artigos (n=5) apresentaram baixo risco. E finalmente, “blind outcome assessors”, apenas três estudos foram identificados com riscos pouco claros (DUAN; GLEASON; LI; HOSUR *et al.*, 2016; LAPÉRINE; CLOITRE; CAILLON; HUCK *et al.*, 2016; PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019), os demais foram classificados como de baixo risco.

Tabela 3. Análise do risco de viés

Itens Risco de viés	Palioto et al., 2019	Mein Lin et al., 2017	Laperine O et al., 2016	de Molon RS et al., 2016	Duan X et al., 2016	de Molon RS et al., 2014	Saadi-Thiers K et al., 2013
Sequence generation							
Baseline characteristics							
Allocation concealment							
Random housing							
Blinding							
Random outcome assessment							
Blind outcome assessors							
Incomplete outcome data							
Selective outcome reporting							
Other sources of bias							

Alto risco de viés Baixo risco de viés Risco de viés pouco claro

Discussão

6. DISCUSSÃO

Modelos animais são amplamente utilizados para estabelecer relações de causa e efeito e via de sinalização mecanicista; sua seleção dependerá do objetivo de cada estudo. Optamos por incluir apenas estudos com camundongos, pois esses animais possuem maior disponibilidade de cepas transgênicas, são relativamente baratos, possuem metabolismo mais rápido, estabelecendo uma melhor relação de causa e efeito entre a DP e a resposta imune do hospedeiro (GRAVES; KANG; ANDRIANKAJA; WADA *et al.*, 2012; LIANG; HOSUR; DOMON; HAJISHENGALLIS, 2010).

Tendo em vista a existência de vários modelos de periodontite experimental, a presente revisão incluiu dois tipos principais que induzem a periodontite por diferentes vias, um por desafio local (LIG) e outro por desafio microbiano sistêmico (GAV). Também foram incluídas suas combinações (LIG+GAV) e associações (LIGbact e I-bact). Esses diferentes mecanismos de indução levantam a questão de quanto eles podem diferir em termos da cronicidade da DP, das vias de resposta do hospedeiro e da duração ou intensidade dos estímulos.

O modelo LIG envolve algumas questões apesar da perda óssea alveolar ser rápida e expressiva podendo ser observada em torno de sete dias (DE MOLON; DE AVILA; BOAS NOGUEIRA; CHAVES DE SOUZA *et al.*, 2014), um quadro agudo é estabelecido e pode refletir um evento completamente diferente em comparação com um quadro crônico patogênese que é característica da periodontite (LIN; NIIMI; OHSUGI; TSUCHIYA *et al.*, 2021). Embora Abe et al. (2013) relatem que a colocação de LIG em camundongos causa perda óssea alveolar pelo acúmulo de bactérias endógenas (ABE; HAJISHENGALLIS, 2013), outros argumentam que a colocação de LIG invariavelmente leva a lesão traumática e, apenas secundariamente, atua como um fator de retenção de biofilme (LI; FENG; TANG; HUANG *et al.*, 2020; MARCHESAN; GIRNARY; JING; MIAO *et al.*, 2018). Há também a alegação de que a natureza traumática de sua colocação seria um fator importante na produção de destruição do tecido periodontal (JIAO; DARZI; TAWARATSUMIDA; MARCHESAN *et al.*, 2013).

Embora alguns estudos tentem manter o LIG em posição por mais tempo para que ocorra uma indução constante e expressiva da doença (DE MOLON; MASCARENHAS; DE AVILA; FINOTI *et al.*, 2016; WU; TAYA; KURAJI; ITO *et al.*, 2020), existe a ideia de que a perda óssea não pode ser sustentada ao longo do tempo, exigindo combinação com bactérias para estabelecer uma condição crônica de periodontite (LIN; HU; WANG; KAWAI *et al.*, 2017; PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019).

Seguindo essa ideia, os modelos GAV são vistos como uma boa opção quando se deseja alcançar cronicidade e modulação do hospedeiro (BOYER; LEROYER; MALHERBE; FONG *et al.*, 2020). No entanto, ainda existem certas contradições entre os resultados obtidos e a quantidade de inoculação realizada durante o período experimental (HARIYANI; HALIMAH; AL-JUNAID; FADHILA *et al.*, 2021). Essa discrepância pode ser observada por meio de dois estudos aqui incluídos (DE MOLON; DE AVILA; BOAS NOGUEIRA; CHAVES DE SOUZA *et al.*, 2014; PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019).

De Molon et al. (2014) com 5 inoculações em intervalos de dois dias para os períodos experimentais de 15 e 30 dias encontraram menor perda óssea em relação ao grupo LIG. No entanto, apenas medidas ósseas foram realizadas e nenhuma abordagem para distinguir os modelos de processo inflamatório sistêmico foi feita. Porém, Palioto et al. (2019) encontraram reabsorção óssea significativa após 6 inoculações (GAV*Pg*) em dias alternados, durante duas semanas consecutivas e os resultados foram mantidos até um período de 42 dias a partir do início da indução. O estudo caracterizou os resultados inflamatórios e epigenéticos na maxila e nos intestinos como sendo muito diversos entre GAV e LIG.

Ao comparar o modelo GAV e sua combinação com LIG (LIG+GAV) versus LIG, observa-se um tempo maior para estabelecer a perda óssea (4 a 6 semanas) (HART; SHAFFER; AKILESH; BROWN *et al.*, 2004), mas diferentemente do grupo LIG, esse resultado pode ainda podem ser observados mesmo após a retirada do estímulo nos grupos em que o patógeno periodontal foi adicionado. Isso sugere que o desafio microbiano sistêmico (GAV) ou sua combinação com o desafio local (LIG+GAV) podem ser boas e talvez as estratégias mais semelhantes para modelar a DP humana.

No entanto, um fato interessante a ser destacado são os resultados controversos encontrados por Palioto et al. (2019) em que a combinação de modelos (LIG+GAV) modificou a expressão sistêmica (soro) de marcadores inflamatórios de forma diferente dos dois modelos por si só - quando GAV foi associado a LIG ocorreu um processo mais pró-resolutivo. Os autores especulam que a retirada da ligadura desencadearia um processo pró-resolutivo que contraria os processos pró-inflamatórios da própria gavagem.

Com relação à associação local de bactérias e LIG, foi possível observar que a presença bacteriana pode agravar a resposta inflamatória a uma lesão mecânica, além de gerar uma resposta sistêmica mais intensa do que LIG ou GAV sozinhos (SAADI-THIERS; HUCK; SIMONIS; TILLY *et al.*, 2013). Esta condição pode ser observada no estudo de Lapérine et al. (2016), pois através deste modelo conseguiram obter perda óssea significativa que persistiu até

28 dias após a indução da periodontite, diferentemente do modelo LIG que não induziu perda relevante em relação a um grupo CONT (LAPÉRINE; CLOITRE; CAILLON; HUCK *et al.*, 2016).

Lin et al. (2017) e de Molon et al. (2014) induziram periodontite por I-bact entre seus grupos experimentais. Foi possível observar a eficiência deste modelo, pois ambos foram capazes de induzir a perda óssea sendo significativa a partir de 15 dias da indução inicial continuando a progredir com o tempo - os tecidos gengivais expressaram um alto pico de inflamação nos primeiros dias, mas essa condição não foi mantida durante todo o experimento (DE MOLON; DE AVILA; BOAS NOGUEIRA; CHAVES DE SOUZA *et al.*, 2014). O mesmo foi observado em Lin et al. (2017) onde os resultados foram bastante heterogêneos e a maioria dos mediadores inflamatórios não foi expressa de forma significativa.

Quando as atividades celulares foram observadas por imunofluorescência e imunocitoquímica na maxila, marcadores inflamatórios (BTLA e IL-18R1) e epigenéticos (DNMT3b) foram mais expressivos nos modelos GAV e LIG+GAV em comparação ao grupo LIG sozinha (PALIOTO; FINOTI; KINANE; BENAKANAKERE, 2019). A presença aumentada desses marcadores na superfície do osso alveolar mostra uma intensa resposta imune inata e adaptativa (IL-18R1), além de identificar possível inflamação sistêmica (BTLA) (SHUBIN; MONAGHAN; HEFFERNAN; CHUNG *et al.*, 2013) e metilação do DNA (DNMT3b) contribui para um inflamatório desregulado e é sinal de reconhecimento de alterações no quadro epigenético (BENAKANAKERE; FINOTI; PALIOTO; TEIXEIRA *et al.*, 2019).

Em relação aos impactos sistêmicos que alguns modelos de indução, principalmente os de infecção oral e GAV, causam no hospedeiro é possível fazer uma ponte entre estudos de periodontite e doenças sistêmicas (MATA; NOBRE; FELIX SILVA; OLIEZER *et al.*, 2021; PARVANEH; WITTING; KU; MORADI *et al.*, 2021; TSUZUNO; TAKAHASHI; YAMADA-HARA; YOKOJI-TAKEUCHI *et al.*, 2021). Estudos sugerem que a administração oral de *Pg*, principal bactéria periodontopatogênica utilizada nesses modelos, altera a microbiota intestinal e aumenta os níveis de marcadores inflamatórios em camundongos sistemicamente comprometidos, o que pode piorar a condição sistêmica do hospedeiro (HAMAMOTO; OUHARA; MUNENAGA; SHOJI *et al.*, 2020; SATO; TAKAHASHI; KATO; MATSUDA *et al.*, 2017). Entre todos os estudos incluídos neste artigo, apenas Palioto et al. (2019) avaliaram os efeitos da periodontite experimental no intestino e mostraram que quando se optou por um desafio bacteriano sistêmico, houve aumento das taxas de marcadores

inflamatórios e epigenéticos quando comparados à indução local (LIG) e também quando associado a indução local e desafio bacteriano (LIG + GAV).

Considerando que a microbiota intestinal se comunica com órgãos periféricos e sua disbiose microbiana prejudica diretamente a modulação do hospedeiro influenciando no desenvolvimento de diversas doenças como obesidade, doenças inflamatórias e imunológicas (SCHROEDER; BÄCKHED, 2016), a hipótese é que modelos de GAV possam ser os principais candidatos quando estudando a associação entre periodontite e doenças sistêmicas (KATO; YAMAZAKI; NAKAJIMA; DATE *et al.*, 2018; TSUZUNO; TAKAHASHI; YAMADA-HARA; YOKOJI-TAKEUCHI *et al.*, 2021).

Durante a busca de dados para esta revisão foram observadas muitas variações metodológicas entre os modelos de indução que diferem em relação aos animais utilizados, inoculações bacterianas e número de dias de ligadura em posição. Em relação à extração dos dados sobre as características de cada artigo aqui incluídos (tabela 1) pudemos observar que camundongos C57BL/6 foram os mais utilizados e os métodos de indução mais presentes foram LIG e GAV. Nos modelos LIG, este foi colocado preferencialmente ao redor do primeiro molar superior; no GAV a bactéria *Pg* (ATCC 33277) foi a mais utilizada. Além disso, o método de avaliação mais utilizado para os resultados da perda óssea alveolar foi a microtomografia computadorizada.

Os principais pontos fortes deste trabalho incluíram uma metodologia de revisão sistemática com uma estratégia de busca reprodutível. No entanto, a revisão foi mais limitada, pois a busca foi realizada por estudos que utilizaram e compararam mais de um método de indução de periodontite e, apenas em camundongos.

Apesar do pequeno número de artigos selecionados (n=7), ao analisar os itens para risco de viés segundo SYRCLE's, a maioria dos estudos incluídos apresentaram baixo risco de viés para todos os tópicos, deixando a desejar apenas nos requisitos “blinding” (cegamento) e “random outcome assessment” (avaliação de resultados aleatórios) que podem ser observados na tabela 4; mostrando ser estudos de qualidade e confiáveis.

Portanto, apesar da variabilidade dos modelos encontrados na literatura, poucos estudos avaliam e comparam a evolução temporal e os resultados locais e sistêmicos da periodontite experimental por meio de diferentes modelos de indução. Esta revisão buscou, na medida do possível, apresentar essas questões na tentativa de auxiliar na escolha de um modelo experimental que seja o mais adequado para responder à questão colocada por cada tipo de estudo para que seus resultados sejam mais assertivos.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Esta revisão forneceu evidências relacionadas aos modelos de indução de periodontite em camundongos e seus resultados, sugerindo que embora a maioria deles seja eficiente em causar perda óssea alveolar, existem diferenças em suas características. Nos casos de ligadura o processo agudo está mais presente, pois a reabsorção é perceptível em curto período; mas após a retirada do estímulo local o hospedeiro tende a se reparar diminuindo a significância dessa perda ao longo do tempo. Quando um desafio bacteriano (LIGbact, LIG*Pg*, GAV ou I-bact) é adicionado, a perda óssea parece mais significativa com maior tempo de indução estabelecendo um processo crônico ao longo do tempo.

Com relação aos desfechos sistêmicos a gavagem apresentou maior potencial de modulação da resposta do hospedeiro com alterações inflamatórias sistêmicas mostrando-se ser mais promissor quando pretende estudar a relação entre periodontite e doenças sistêmicas crônicas.

Referências

REFERÊNCIAS

ABE, T.; HAJISHENGALLIS, G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. **J Immunol Methods**, 394, n. 1-2, p. 49-54, Aug 30 2013.

AKKAOUI, J.; YAMADA, C.; DUARTE, C.; HO, A. *et al.* Contribution of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide to experimental periodontitis in relation to aging. **Geroscience**, Aug 26 2020.

AMAR, S.; ZHOU, Q.; SHAIK-DASTHAGIRISAHEB, Y.; LEEMAN, S. Diet-induced obesity in mice causes changes in immune responses and bone loss manifested by bacterial challenge. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 104, n. 51, p. 20466-20471, Dec 18 2007.

ARIMATSU, K.; YAMADA, H.; MIYAZAWA, H.; MINAGAWA, T. *et al.* Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. **Sci Rep**, 4, p. 4828, May 6 2014.

BAKER, P. J.; DIXON, M.; EVANS, R. T.; ROOPENIAN, D. C. Heterogeneity of Porphyromonas gingivalis strains in the induction of alveolar bone loss in mice. **Oral Microbiol Immunol**, 15, n. 1, p. 27-32, Feb 2000.

BAKER, P. J.; DIXON, M.; ROOPENIAN, D. C. Genetic control of susceptibility to Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss in mice. **Infect Immun**, 68, n. 10, p. 5864-5868, Oct 2000.

BAKER, P. J.; EVANS, R. T.; ROOPENIAN, D. C. Oral infection with Porphyromonas gingivalis and induced alveolar bone loss in immunocompetent and severe combined immunodeficient mice. **Arch Oral Biol**, 39, n. 12, p. 1035-1040, Dec 1994.

BECK, J. D.; PAPAPANOU, P. N.; PHILIPS, K. H.; OFFENBACHER, S. Periodontal Medicine: 100 Years of Progress. **J Dent Res**, 98, n. 10, p. 1053-1062, 09 2019.

BENAKANAKERE, M. R.; FINOTI, L.; PALIOTO, D. B.; TEIXEIRA, H. S. *et al.* Epigenetics, Inflammation, and Periodontal Disease. **Current Oral Health Reports**, 6, n. 1, p. 37-46, 2019.

BEZERRA, M. M.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A.; ROCHA, F. A. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. **Braz J Med Biol Res**, 35, n. 5, p. 613-616, May 2002.

BOYER, E.; LEROYER, P.; MALHERBE, L.; FONG, S. B. *et al.* Oral dysbiosis induced by. **J Oral Microbiol**, 12, n. 1, p. 1832837, Oct 12 2020.

CAMPBELL, M.; MCKENZIE, J. E.; SOWDEN, A.; KATIKIREDDI, S. V. *et al.* Synthesis without meta-analysis (SWiM) in systematic reviews: reporting guideline. **BMJ**, 368, p. l6890, 01 16 2020.

CANABARRO, A.; VALLE, C.; FARIAS, M. R.; SANTOS, F. B. *et al.* Association of subgingival colonization of Candida albicans and other yeasts with severity of chronic periodontitis. **J Periodontal Res**, 48, n. 4, p. 428-432, Aug 2013.

DARVEAU, R. P.; HAJISHENGALLIS, G.; CURTIS, M. A. Porphyromonas gingivalis as a potential community activist for disease. **J Dent Res**, 91, n. 9, p. 816-820, Sep 2012.

DE AQUINO, S. G.; GUIMARAES, M. R.; STACH-MACHADO, D. R.; DA SILVA, J. A. *et al.* Differential regulation of MMP-13 expression in two models of experimentally induced periodontal disease in rats. **Arch Oral Biol**, 54, n. 7, p. 609-617, Jul 2009.

DE MOLON, R. S.; DE AVILA, E. D.; BOAS NOGUEIRA, A. V.; CHAVES DE SOUZA, J. A. *et al.* Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. **J Periodontol**, 85, n. 3, p. 465-477, Mar 2014.

DE MOLON, R. S.; DE AVILA, E. D.; CIRELLI, J. A. Host responses induced by different animal models of periodontal disease: a literature review. **J Investig Clin Dent**, 4, n. 4, p. 211-218, Nov 2013.

DE MOLON, R. S.; MASCARENHAS, V. I.; DE AVILA, E. D.; FINOTI, L. S. *et al.* Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice. **Clin Oral Investig**, 20, n. 6, p. 1203-1216, Jul 2016.

DE MOLON, R. S.; PARK, C. H.; JIN, Q.; SUGAI, J. *et al.* Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. **Microsc Res Tech**, 81, n. 12, p. 1412-1421, Dec 2018.

DENG, S.; HU, Y.; ZHOU, J.; WANG, Y. *et al.* TLR4 mediates alveolar bone resorption in experimental peri-implantitis through regulation of CD45(+) cell infiltration, RANKL/OPG ratio, and inflammatory cytokine production. **J Periodontol**, 91, n. 5, p. 671-682, May 2020.

DUAN, X.; GLEASON, R. C.; LI, F.; HOSUR, K. B. *et al.* Sex dimorphism in periodontitis in animal models. **J Periodontal Res**, 51, n. 2, p. 196-202, Apr 2016.

DUARTE, P. M.; TEZOLIN, K. R.; FIGUEIREDO, L. C.; FERES, M. *et al.* Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. **Arch Oral Biol**, 55, n. 2, p. 142-147, Feb 2010.

DUMITRESCU, A. L.; ABD-EL-ALEEM, S.; MORALES-AZA, B.; DONALDSON, L. F. A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. **J Clin Periodontol**, 31, n. 8, p. 596-603, Aug 2004.

EBBERS, M.; LÜBCKE, P. M.; VOLZKE, J.; KRIEBEL, K. *et al.* Interplay between P. gingivalis, F. nucleatum and A. actinomycetemcomitans in murine alveolar bone loss, arthritis onset and progression. **Sci Rep**, 8, n. 1, p. 15129, Oct 11 2018.

EBERSOLE, J. L.; FEUILLE, F.; KESAVALU, L.; HOLT, S. C. Host modulation of tissue destruction caused by periodontopathogens: effects on a mixed microbial infection composed of Porphyromonas gingivalis and Fusobacterium nucleatum. **Microb Pathog**, 23, n. 1, p. 23-32, Jul 1997.

GALENO, J. G.; FRANÇA, L. F. C.; DA SILVA, F. R. P.; ALVES, E. H. P. *et al.* Renal alterations caused by ligature-induced periodontitis persist after ligature removal in rats. **J Periodontal Res**, 56, n. 2, p. 306-313, Apr 2021.

GAO, L.; KANG, M.; ZHANG, M. J.; REZA SAILANI, M. *et al.* Polymicrobial periodontal disease triggers a wide radius of effect and unique virome. **NPJ Biofilms Microbiomes**, 6, n. 1, p. 10, 03 2020.

GARLET, G. P.; CARDOSO, C. R.; MARIANO, F. S.; CLAUDINO, M. *et al.* Regulatory T cells attenuate experimental periodontitis progression in mice. **Journal of Clinical Periodontology**, 37, n. 7, p. 591-600, 2010.

GENCO, C. A.; VAN DYKE, T.; AMAR, S. Animal models for Porphyromonas gingivalis-mediated periodontal disease. **Trends Microbiol**, 6, n. 11, p. 444-449, Nov 1998.

GENCO, R. J.; SANZ, M. Clinical and public health implications of periodontal and systemic diseases: An overview. **Periodontol 2000**, 83, n. 1, p. 7-13, Jun 2020.

GRAVES, D. T.; FINE, D.; TENG, Y. T.; VAN DYKE, T. E. *et al.* The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. **J Clin Periodontol**, 35, n. 2, p. 89-105, Feb 2008.

GRAVES, D. T.; KANG, J.; ANDRIANKAJA, O.; WADA, K. *et al.* Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. **Front Oral Biol**, 15, p. 117-132, 2012.

HAJISHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nat Rev Immunol**, 15, n. 1, p. 30-44, Jan 2015.

HAJISHENGALLIS, G.; DARVEAU, R. P.; CURTIS, M. A. The keystone-pathogen hypothesis. **Nat Rev Microbiol**, 10, n. 10, p. 717-725, Oct 2012.

HAJISHENGALLIS, G.; DIAZ, P. I.: Immune subversion activities and role in periodontal dysbiosis. **Curr Oral Health Rep**, 7, n. 1, p. 12-21, Mar 2020.

HAJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R. J. Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. **Molecular Oral Microbiology**, 27, n. 6, p. 409-419, 2012.

HAJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R. J. Polymicrobial communities in periodontal disease: Their quasi-organismal nature and dialogue with the host. **Periodontol 2000**, 86, n. 1, p. 210-230, 06 2021.

HAJISHENGALLIS, G.; LIANG, S.; PAYNE, M. A.; HASHIM, A. *et al.* Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. **Cell Host and Microbe**, 10, n. 5, p. 497-506, 2011.

HAMAMOTO, Y.; OUHARA, K.; MUNENAGA, S.; SHOJI, M. *et al.* Effect of Porphyromonas gingivalis infection on gut dysbiosis and resultant arthritis exacerbation in mouse model. **Arthritis Res Ther**, 22, n. 1, p. 249, 10 19 2020.

HARIYANI, N.; HALIMAH, A. N.; AL-JUNAID, M.; FADHILA, O. *et al.* Mouse periodontitis models using whole. **Saudi Dent J**, 33, n. 8, p. 819-825, Dec 2021.

HART, G. T.; SHAFFER, D. J.; AKILESH, S.; BROWN, A. C. *et al.* Quantitative gene expression profiling implicates genes for susceptibility and resistance to alveolar bone loss. **Infect Immun**, 72, n. 8, p. 4471-4479, Aug 2004.

HIRSCH, R. S.; CLARKE, N. G. Infection and periodontal diseases. **Rev Infect Dis**, 11, n. 5, p. 707-715, 1989 Sep-Oct 1989.

HIYARI, S.; ATTI, E.; CAMARGO, P. M.; ESKIN, E. *et al.* Heritability of periodontal bone loss in mice. **J Periodontal Res**, 50, n. 6, p. 730-736, Dec 2015.

HOLT, S. C.; EBERSOLE, J.; FELTON, J.; BRUNSVOLD, M. *et al.* Implantation of Bacteroides gingivalis in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. **Science**, 239, n. 4835, p. 55-57, Jan 01 1988.

HOOIJMANS, C. R.; ROVERS, M. M.; DE VRIES, R. B.; LEENAARS, M. *et al.* SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. **BMC Med Res Methodol**, 14, p. 43, Mar 2014.

ILIEVSKI, V.; CHO, Y.; KATWALA, P.; RODRIGUEZ, H. *et al.* TLR4 Expression by Liver Resident Cells Mediates the Development of Glucose Intolerance and Insulin Resistance in Experimental Periodontitis. **PLoS One**, 10, n. 8, p. e0136502, 2015.

JIAO, Y.; DARZI, Y.; TAWARATSUMIDA, K.; MARCHESAN, J. T. *et al.* Induction of bone loss by pathobiont-mediated Nod1 signaling in the oral cavity. **Cell Host Microbe**, 13, n. 5, p. 595-601, May 15 2013.

JIAO, Y.; HASEGAWA, M.; INOHARA, N. Emerging roles of immunostimulatory oral bacteria in periodontitis development. **Trends Microbiol**, 22, n. 3, p. 157-163, Mar 2014.

JUNG, Y. O.; CHO, M. L.; LEE, S. Y.; OH, H. J. *et al.* Synergism of toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and TLR6 ligation on the production of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in a spontaneous arthritis animal model of interleukin (IL)-1 receptor antagonist-deficient mice. **Immunol Lett**, 123, n. 2, p. 138-143, Apr 27 2009.

KATO, T.; YAMAZAKI, K.; NAKAJIMA, M.; DATE, Y. *et al.* Oral Administration of Porphyromonas gingivalis Alters the Gut Microbiome and Serum Metabolome. **mSphere**, 3, n. 5, 10 17 2018.

KESAVALU, L.; SATHISHKUMAR, S.; BAKTHAVATCHALU, V.; MATTHEWS, C. *et al.* Rat model of polymicrobial infection, immunity, and alveolar bone resorption in periodontal disease. **Infect Immun**, 75, n. 4, p. 1704-1712, Apr 2007.

KIMURA, S.; NAGAI, A.; ONITSUKA, T.; KOGA, T. *et al.* Induction of experimental periodontitis in mice with Porphyromonas gingivalis-adhered ligatures. **J Periodontol**, 71, n. 7, p. 1167-1173, Jul 2000.

KLAUSEN, B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **J Periodontol**, 62, n. 1, p. 59-73, Jan 1991.

KLEINSTEIN, S. E.; NELSON, K. E.; FREIRE, M. Inflammatory Networks Linking Oral Microbiome with Systemic Health and Disease. **J Dent Res**, 99, n. 10, p. 1131-1139, 09 2020.

KORAH, L.; AMRI, N.; BUGUENO, I. M.; HOTTON, D. *et al.* Experimental periodontitis in Msx2 mutant mice induces alveolar bone necrosis. **Journal of periodontology**, 91, n. 5, p. 693-704, 2020.

KOU, Y.; JIANG, Y.; LIU, S.; YANG, P. *et al.* Regulatory T cells showed characteristics of T helper-17(Th17) cells in mice periodontitis model. **Oral Dis**, Nov 05 2021.

KUHR, A.; POPA-WAGNER, A.; SCHMOLL, H.; SCHWAHN, C. *et al.* Observations on experimental marginal periodontitis in rats. **J Periodontal Res**, 39, n. 2, p. 101-106, Apr 2004.

KUMAR, P. S. Microbial dysbiosis: The root cause of periodontal disease. **J Periodontol**, 92, n. 8, p. 1079-1087, 08 2021.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, 33, n. 1, p. 159-174, Mar 1977.

LAPÉRINE, O.; CLOITRE, A.; CAILLON, J.; HUCK, O. *et al.* Interleukin-33 and RANK-L Interplay in the Alveolar Bone Loss Associated to Periodontitis. **PLoS One**, 11, n. 12, p. e0168080, 2016.

LEIRA, Y.; IGLESIAS-REY, R.; GÓMEZ-LADO, N.; AGUIAR, P. *et al.* Periodontitis and vascular inflammatory biomarkers: an experimental in vivo study in rats. **Odontology**, 108, n. 2, p. 202-212, Apr 2020.

LI, C. H.; AMAR, S. Morphometric, histomorphometric, and microcomputed tomographic analysis of periodontal inflammatory lesions in a murine model. **J Periodontol**, 78, n. 6, p. 1120-1128, Jun 2007.

LI, D.; FENG, Y.; TANG, H.; HUANG, L. *et al.* A Simplified and Effective Method for Generation of Experimental Murine Periodontitis Model. **Front Bioeng Biotechnol**, 8, p. 444, 2020.

LI, L.; BAO, J.; CHANG, Y.; WANG, M. *et al.* Gut Microbiota May Mediate the Influence of Periodontitis on Prediabetes. **J Dent Res**, 100, n. 12, p. 1387-1396, Nov 2021.

LI, Y.; LU, Z.; ZHANG, X.; YU, H. *et al.* Metabolic Syndrome Exacerbates Inflammation and Bone Loss in Periodontitis. **Journal of Dental Research**, 94, n. 2, p. 362-370, Feb 2015.

LIANG, S.; HOSUR, K. B.; DOMON, H.; HAJISHENGALLIS, G. Periodontal inflammation and bone loss in aged mice. **J Periodontal Res**, 45, n. 4, p. 574-578, Aug 2010.

LIN, J.; BI, L.; YU, X.; KAWAI, T. *et al.* Porphyromonas gingivalis exacerbates ligature-induced, RANKL-dependent alveolar bone resorption via differential regulation of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4. **Infect Immun**, 82, n. 10, p. 4127-4134, Oct 2014.

LIN, M.; HU, Y.; WANG, Y.; KAWAI, T. *et al.* Different engagement of TLR2 and TLR4 in Porphyromonas gingivalis vs. ligature-induced periodontal bone loss. **Braz Oral Res**, 31, p. e63, Aug 21 2017.

LIN, P.; NIIMI, H.; OHSUGI, Y.; TSUCHIYA, Y. *et al.* Application of Ligature-Induced Periodontitis in Mice to Explore the Molecular Mechanism of Periodontal Disease. **Int J Mol Sci**, 22, n. 16, Aug 18 2021.

MA, Z.; DAGNAES-HANSEN, F.; LØVSCHALL, H.; SONG, W. *et al.* Macrophage-mediated nanoparticle delivery to the periodontal lesions in established murine model via Pg-LPS induction. **J Oral Pathol Med**, 44, n. 7, p. 538-542, Aug 2015.

MADDEN, T. E.; CATON, J. G. Animal models for periodontal disease. **Methods Enzymol**, 235, p. 106-119, 1994.

MARCHESAN, J.; GIRNARY, M. S.; JING, L.; MIAO, M. Z. *et al.* An experimental murine model to study periodontitis. **Nat Protoc**, 13, n. 10, p. 2247-2267, Oct 2018.

MATA, K.; NOBRE, A. V. V.; FELIX SILVA, P. H.; OLIEZER, R. S. *et al.* A new mixed model of periodontitis-induced preeclampsia: A pilot study. **J Periodontal Res**, 56, n. 4, p. 726-734, Aug 2021.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, 454, n. 7203, p. 428-435, Jul 24 2008.

MEULMAN, T.; PERUZZO, D. C.; STIPP, R. N.; GONÇALVES, P. F. *et al.* Impact of Porphyromonas gingivalis inoculation on ligature-induced alveolar bone loss. A pilot study in rats. **J Periodontal Res**, 46, n. 5, p. 629-636, Oct 2011.

MEURIC, V.; MARTIN, B.; GUYODO, H.; ROUILLON, A. *et al.* Treponema denticola improves adhesive capacities of Porphyromonas gingivalis. **Mol Oral Microbiol**, 28, n. 1, p. 40-53, Feb 2013.

MIYAUCHI, S.; MAEKAWA, T.; AOKI, Y.; MIYAZAWA, H. *et al.* Oral infection with Porphyromonas gingivalis and systemic cytokine profile in C57BL/6.KOR-ApoE shl mice. **J Periodontal Res**, 47, n. 3, p. 402-408, Jun 2012.

MONASTERIO, G.; CASTILLO, F.; IBARRA, J. P.; GUEVARA, J. *et al.* Alveolar bone resorption and Th1/Th17-associated immune response triggered during Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced experimental periodontitis are serotype-dependent. **J Periodontol**, 89, n. 10, p. 1249-1261, Oct 2018.

MUSTAFA, H.; CHENG, C. H.; RADZI, R.; FONG, L. S. *et al.* Induction of periodontal disease via retentive ligature, lipopolysaccharide injection, and their combination in a rat model. **Pol J Vet Sci**, 24, n. 3, p. 365-373, Sep 2021.

NAIR, S. P.; MEGHJI, S.; WILSON, M.; REDDI, K. *et al.* Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. **Infect Immun**, 64, n. 7, p. 2371-2380, Jul 1996.

NAKAJIMA, K.; HAMADA, N.; TAKAHASHI, Y.; SASAGURI, K. *et al.* Restraint stress enhances alveolar bone loss in an experimental rat model. **J Periodontal Res**, 41, n. 6, p. 527-534, Dec 2006.

NISHIDA, E.; HARA, Y.; KANEKO, T.; IKEDA, Y. *et al.* Bone resorption and local interleukin-1alpha and interleukin-1beta synthesis induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide. **J Periodontal Res**, 36, n. 1, p. 1-8, Feb 2001.

NOVAES, A. B.; RAMOS, U. D.; SCOMBATTI DE SOUZA, S. L.; MUGLIA, V. A. *et al.* The Effect of Antimicrobial Photodynamic Therapy in the Osseointegration of Immediately Placed Implants in Sites with Ligature-Induced Periodontitis in Dogs. **Int J Periodontics Restorative Dent**, 40, n. 6, p. 917-923, 2020 Nov/Dec 2020.

OLSEN, I.; LAMBRIS, J. D.; HAJISHENGALLIS, G. Porphyromonas gingivalis disturbs host-commensal homeostasis by changing complement function. **J Oral Microbiol**, 9, n. 1, p. 1340085, 2017.

OLSEN, I.; YAMAZAKI, K. Can oral bacteria affect the microbiome of the gut? **J Oral Microbiol**, 11, n. 1, p. 1586422, 2019.

ORCEL, P.; FEUGA, M.; BIELAKOFF, J.; DE VERNEJOUL, M. C. Local bone injections of LPS and M-CSF increase bone resorption by different pathways in vivo in rats. **Am J Physiol**, 264, n. 3 Pt 1, p. E391-397, Mar 1993.

OZ, H. S.; PULEO, D. A. Animal models for periodontal disease. **J Biomed Biotechnol**, 2011, p. 754857, 2011.

PAGE, M. J.; MCKENZIE, J. E.; BOSSUYT, P. M.; BOUTRON, I. *et al.* The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. **Rev Esp Cardiol (Engl Ed)**, 74, n. 9, p. 790-799, Sep 2021.

PALIOTO, D. B.; FINOTI, L. S.; KINANE, D. F.; BENAKANAKERE, M. Epigenetic and inflammatory events in experimental periodontitis following systemic microbial challenge. **J Clin Periodontol**, 46, n. 8, p. 819-829, Aug 2019.

PARVANEH, M.; WITTING, P. K.; KU, J.; MORADI, T. *et al.* Periodontitis induces endothelial dysfunction in mice. **Sci Rep**, 11, n. 1, p. 14993, Jul 22 2021.

POLAK, D.; WILENSKY, A.; SHAPIRA, L.; HALABI, A. *et al.* Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response. **J Clin Periodontol**, 36, n. 5, p. 406-410, May 2009.

QIAN, X.; ZHANG, S.; DUAN, L.; YANG, F. *et al.* Periodontitis Deteriorates Cognitive Function and Impairs Neurons and Glia in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis**, 79, n. 4, p. 1785-1800, 2021.

RAMAMURTHY, N. S.; XU, J. W.; BIRD, J.; BAXTER, A. *et al.* Inhibition of alveolar bone loss by matrix metalloproteinase inhibitors in experimental periodontal disease. **J Periodontal Res**, 37, n. 1, p. 1-7, Feb 2002.

REDDI, K.; POOLE, S.; NAIR, S.; MEGHJI, S. *et al.* Lipid A-associated proteins from periodontopathogenic bacteria induce interleukin-6 production by human gingival fibroblasts and monocytes. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 11, n. 2, p. 137-144, Apr 1995.

RIBEIRO, A. B.; SANTOS-JUNIOR, N. N.; LUIZ, J. P. M.; DE OLIVEIRA, M. *et al.* Cardiovascular and Autonomic Dysfunction in Murine Ligature-Induced Periodontitis. **Scientific reports**, 10, n. 1, p. 6891, 2020. Article.

RICHTER, G. M.; KRUPPA, J.; KECELI, H. G.; ATAMAN-DURUEL, E. T. *et al.* Epigenetic adaptations of the masticatory mucosa to periodontal inflammation. **Clin Epigenetics**, 13, n. 1, p. 203, 11 03 2021.

RIETSCHEL, E. T.; BRADE, H. Bacterial endotoxins. **Sci Am**, 267, n. 2, p. 54-61, Aug 1992.

ROGERS, J. E.; LI, F.; COATNEY, D. D.; ROSSA, C. *et al.* Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. **J Periodontol**, 78, n. 3, p. 550-558, Mar 2007.

ROVIN, S.; COSTICH, E. R.; GORDON, H. A. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. **J Periodontal Res**, 1, n. 3, p. 193-204, 1966.

SAADI-THIERS, K.; HUCK, O.; SIMONIS, P.; TILLY, P. *et al.* Periodontal and systemic responses in various mice models of experimental periodontitis: respective roles of inflammation duration and Porphyromonas gingivalis infection. **J Periodontol**, 84, n. 3, p. 396-406, Mar 2013.

SATO, K.; TAKAHASHI, N.; KATO, T.; MATSUDA, Y. *et al.* Aggravation of collagen-induced arthritis by orally administered Porphyromonas gingivalis through modulation of the gut microbiota and gut immune system. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 6955, Jul 31 2017.

SATO, K.; YOKOJI, M.; YAMADA, M.; NAKAJIMA, T. *et al.* An orally administered oral pathobiont and commensal have comparable and innocuous systemic effects in germ-free mice. **J Periodontal Res**, 53, n. 6, p. 950-960, Dec 2018.

SAWA, Y.; TAKATA, S.; HATAKEYAMA, Y.; ISHIKAWA, H. *et al.* Expression of toll-like receptor 2 in glomerular endothelial cells and promotion of diabetic nephropathy by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide. **PLoS One**, 9, n. 5, p. e97165, 2014.

SCANU, A.; GIRAUDO, C.; GALUPPINI, F.; LAZZARIN, V. *et al.* Periodontal Injection of Lipopolysaccharide Promotes Arthritis Development in Mice. **Inflammation**, 42, n. 3, p. 1117-1128, Jun 2019.

SCHROEDER, B. O.; BÄCKHED, F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. **Nat Med**, 22, n. 10, p. 1079-1089, 10 2016.

SHUBIN, N. J.; MONAGHAN, S. F.; HEFFERNAN, D. S.; CHUNG, C. S. *et al.* B and T lymphocyte attenuator expression on CD4+ T-cells associates with sepsis and subsequent infections in ICU patients. **Crit Care**, 17, n. 6, p. R276, Nov 29 2013.

SIMAS, A. M.; KRAMER, C. D.; WEINBERG, E. O.; GENCO, C. A. Oral infection with a periodontal pathogen alters oral and gut microbiomes. **Anaerobe**, 71, p. 102399, Oct 2021.

SINGHRAO, S. K.; OLSEN, I. Are Porphyromonas gingivalis Outer Membrane Vesicles Microbullets for Sporadic Alzheimer's Disease Manifestation? **J Alzheimers Dis Rep**, 2, n. 1, p. 219-228, Dec 20 2018.

SISMEY-DURRANT, H. J.; HOPPS, R. M. Effect of lipopolysaccharide from Porphyromonas gingivalis on prostaglandin E2 and interleukin-1-beta release from rat periosteal and human gingival fibroblasts in vitro. **Oral Microbiol Immunol**, 6, n. 6, p. 378-380, Dec 1991.

SLOCUM, C.; KRAMER, C.; GENCO, C. A. Immune dysregulation mediated by the oral microbiome: potential link to chronic inflammation and atherosclerosis. **J Intern Med**, 280, n. 1, p. 114-128, 07 2016.

STRUILLOU, X.; BOUTIGNY, H.; SOUEIDAN, A.; LAYROLLE, P. Experimental animal models in periodontology: a review. **Open Dent J**, 4, p. 37-47, Apr 29 2010.

SUH, J. S.; KIM, S.; BOSTRÖM, K. I.; WANG, C. Y. *et al.* Periodontitis-induced systemic inflammation exacerbates atherosclerosis partly via endothelial-mesenchymal transition in mice. **Int J Oral Sci**, 11, n. 3, p. 21, Jul 1 2019.

TAGUCHI, H.; AONO, Y.; KAWATO, T.; ASANO, M. *et al.* Intragingival injection of Porphyromonas gingivalis-derived lipopolysaccharide induces a transient increase in gingival tumour necrosis factor-α, but not interleukin-6, in anaesthetised rats. **Int J Oral Sci**, 7, n. 3, p. 155-160, Sep 14 2015.

TAMURA, H.; MAEKAWA, T.; HIYOSHI, T.; TERAO, Y. Analysis of Experimental Ligature-Induced Periodontitis Model in Mice. **Methods Mol Biol**, 2210, p. 237-250, 2021.

TOBIAS, P. S.; GEGNER, J.; TAPPING, R.; ORR, S. *et al.* Lipopolysaccharide dependent cellular activation. **J Periodontal Res**, 32, n. 1 Pt 2, p. 99-103, Jan 1997.

TSUZUNO, T.; TAKAHASHI, N.; YAMADA-HARA, M.; YOKOJI-TAKEUCHI, M. *et al.* Ingestion of Porphyromonas gingivalis exacerbates colitis via intestinal epithelial barrier disruption in mice. **J Periodontal Res**, 56, n. 2, p. 275-288, Apr 2021.

USUI, M.; ONIZUKA, S.; SATO, T.; KOKABU, S. *et al.* Mechanism of alveolar bone destruction in periodontitis - Periodontal bacteria and inflammation. **Jpn Dent Sci Rev**, 57, p. 201-208, Nov 2021.

VAN DYKE, T. E.; BARTOLD, P. M.; REYNOLDS, E. C. The Nexus Between Periodontal Inflammation and Dysbiosis. **Front Immunol**, 11, p. 511, 2020.

VARGAS-SANCHEZ, P. K.; MORO, M. G.; SANTOS, F. A. D.; ANBINDER, A. L. *et al.* Agreement, correlation, and kinetics of the alveolar bone-loss measurement methodologies in a ligature-induced periodontitis animal model. **J Appl Oral Sci**, 25, n. 5, p. 490-497, Sep-Oct 2017.

WANG, X.; TONG, Y.; ZHANG, J.; KHAN, N. *et al.* Neuroinflammation changes with periodontal inflammation status during periodontitis in wild-type mice. **Oral Dis**, 27, n. 4, p. 1001-1011, May 2021.

WILENSKY, A.; POLAK, D.; AWAWDI, S.; HALABI, A. *et al.* Strain-dependent activation of the mouse immune response is correlated with Porphyromonas gingivalis-induced experimental periodontitis. **J Clin Periodontol**, 36, n. 11, p. 915-921, Nov 2009.

WONG, R. L.; HIYARI, S.; YAGHSEZIAN, A.; DAVAR, M. *et al.* Early intervention of peri-implantitis and periodontitis using a mouse model. **J Periodontol**, 89, n. 6, p. 669-679, Jun 2018.

WRIGHT, C. J.; BURNS, L. H.; JACK, A. A.; BACK, C. R. *et al.* Microbial interactions in building of communities. **Mol Oral Microbiol**, 28, n. 2, p. 83-101, Apr 2013.

WU, Y. H.; TAYA, Y.; KURAJI, R.; ITO, H. *et al.* Dynamic microstructural changes in alveolar bone in ligature-induced experimental periodontitis. **Odontology**, 108, n. 3, p. 339-349, Jul 2020.

YUAN, H.; GUPTE, R.; ZELKHA, S.; AMAR, S. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand antagonists inhibit tissue inflammation and bone loss in experimental periodontitis. **J Clin Periodontol**, 38, n. 11, p. 1029-1036, Nov 2011.

ÇALIŞIR, M.; AKPINAR, A.; POYRAZ, Ö.; GÖZE, F. *et al.* The histopathological and morphometric investigation of the effects of systemically administered humic acid on alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in rats. **J Periodontal Res**, 51, n. 4, p. 499-507, Aug 2016.

Anexos

ANEXOS

ANEXO 1. PRISMA 2020 checklist

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
TITLE			
Title	1	Identify the report as a systematic review.	
ABSTRACT			
Abstract	2	See the PRISMA 2020 for Abstracts checklist.	
INTRODUCTION			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of existing knowledge.	
Objectives	4	Provide an explicit statement of the objective(s) or question(s) the review addresses.	
METHODS			
Eligibility criteria	5	Specify the inclusion and exclusion criteria for the review and how studies were grouped for the syntheses.	
Information sources	6	Specify all databases, registers, websites, organisations, reference lists and other sources searched or consulted to identify studies. Specify the date when each source was last searched or consulted.	
Search strategy	7	Present the full search strategies for all databases, registers and websites, including any filters and limits used.	
Selection process	8	Specify the methods used to decide whether a study met the inclusion criteria of the review, including how many reviewers screened each record and each report retrieved, whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	
Data collection process	9	Specify the methods used to collect data from reports, including how many reviewers collected data from each report, whether they worked independently, any processes for obtaining or confirming data from study investigators, and if applicable, details of automation tools used in the process.	
Data items	10a	List and define all outcomes for which data were sought. Specify whether all results that were compatible with each outcome domain in each study were sought (e.g. for all measures, time points, analyses), and if not, the methods used to decide which results to collect.	
	10b	List and define all other variables for which data were sought (e.g. participant and intervention characteristics, funding sources). Describe any assumptions made about any missing or unclear information.	

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
Study risk of bias assessment	11	Specify the methods used to assess risk of bias in the included studies, including details of the tool(s) used, how many reviewers assessed each study and whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	
Effect measures	12	Specify for each outcome the effect measure(s) (e.g. risk ratio, mean difference) used in the synthesis or presentation of results.	
Synthesis methods	13a	Describe the processes used to decide which studies were eligible for each synthesis (e.g. tabulating the study intervention characteristics and comparing against the planned groups for each synthesis (item #5)).	
	13b	Describe any methods required to prepare the data for presentation or synthesis, such as handling of missing summary statistics, or data conversions.	
	13c	Describe any methods used to tabulate or visually display results of individual studies and syntheses.	
	13d	Describe any methods used to synthesize results and provide a rationale for the choice(s). If meta-analysis was performed, describe the model(s), method(s) to identify the presence and extent of statistical heterogeneity, and software package(s) used.	
	13e	Describe any methods used to explore possible causes of heterogeneity among study results (e.g. subgroup analysis, meta-regression).	
	13f	Describe any sensitivity analyses conducted to assess robustness of the synthesized results.	
Reporting bias assessment	14	Describe any methods used to assess risk of bias due to missing results in a synthesis (arising from reporting biases).	
Certainty assessment	15	Describe any methods used to assess certainty (or confidence) in the body of evidence for an outcome.	
RESULTS			
Study selection	16a	Describe the results of the search and selection process, from the number of records identified in the search to the number of studies included in the review, ideally using a flow diagram.	
	16b	Cite studies that might appear to meet the inclusion criteria, but which were excluded, and explain why they were excluded.	
Study characteristics	17	Cite each included study and present its characteristics.	
Risk of bias in studies	18	Present assessments of risk of bias for each included study.	

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
Results of individual studies	19	For all outcomes, present, for each study: (a) summary statistics for each group (where appropriate) and (b) an effect estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval), ideally using structured tables or plots.	
Results of syntheses	20a	For each synthesis, briefly summarise the characteristics and risk of bias among contributing studies.	
	20b	Present results of all statistical syntheses conducted. If meta-analysis was done, present for each the summary estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval) and measures of statistical heterogeneity. If comparing groups, describe the direction of the effect.	
	20c	Present results of all investigations of possible causes of heterogeneity among study results.	
	20d	Present results of all sensitivity analyses conducted to assess the robustness of the synthesized results.	
Reporting biases	21	Present assessments of risk of bias due to missing results (arising from reporting biases) for each synthesis assessed.	
Certainty of evidence	22	Present assessments of certainty (or confidence) in the body of evidence for each outcome assessed.	
DISCUSSION			
Discussion	23a	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence.	
	23b	Discuss any limitations of the evidence included in the review.	
	23c	Discuss any limitations of the review processes used.	
	23d	Discuss implications of the results for practice, policy, and future research.	
OTHER INFORMATION			
Registration and protocol	24a	Provide registration information for the review, including register name and registration number, or state that the review was not registered.	
	24b	Indicate where the review protocol can be accessed, or state that a protocol was not prepared.	
	24c	Describe and explain any amendments to information provided at registration or in the protocol.	
Support	25	Describe sources of financial or non-financial support for the review, and the role of the funders or sponsors in the review.	
Competing interests	26	Declare any competing interests of review authors.	
Availability of data, code and other materials	27	Report which of the following are publicly available and where they can be found: template data collection forms; data extracted from included studies; data used for all	

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
		analyses; analytic code; any other materials used in the review.	

From: Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. BMJ 2021;372:n71. doi: 10.1136/bmj.n71

ANEXO 2. Estratégias de busca em bancos de dados

Bancos de dados incluídos, termos de pesquisa e estratégias de pesquisa	
Banco de dados	Pubmed, Embase, Cochrane, Scopus, Web of Science, Medline, Lilacs
Termos de pesquisa	Periodontitis, Periodontal disease, Alveolar bone lose, Bone Resorption, Experimental model,Ligation,Ligadure,Injection, Gavage, Gram-Negative Bacterial Infections, Polymicrobial Infection, Host-Pathogen Interactions, Chronic Inflammations, Acute Inflammations and Murine.
Estratégia de busca (PubMed) **RESULTADOS: 3775**	(Periodontitis OR Periodontitides OR Pericementitis OR Pericementitides OR Disease, Periodontal OR Diseases, Periodontal OR Periodontal Disease OR Parodontosis OR Parodontoses OR Pyorrhea Alveolaris OR Alveolar Bone Losses OR Alveolar Process Atrophy OR Alveolar Process Atrophies OR Alveolar Resorption OR Alveolar Resorptions OR Resorption, Alveolar OR Resorptions, Alveolar OR Bone Loss, Periodontal OR Bone Losses, Periodontal OR Periodontal Bone Loss OR Periodontal Resorption OR Periodontal Resorptions OR Resorption, Periodontal OR Alveolar Bone Atrophy OR Alveolar Bone Atrophies OR Bone Atrophies, Alveolar OR Bone Atrophy, Alveolar OR Bone Loss, Alveolar OR interradicular bone loss OR interradicular bone) AND (Periodontal Disease Induction, Experimental Periodontitis OR Experimental Model OR Model, Experimental OR Models, Experimental OR Experimental Models OR Animal Model OR Animal Models OR Model, Animal OR Laboratory Animal Models OR Animal Model, Laboratory OR Animal Models, Laboratory OR Laboratory Animal Model OR Model, Laboratory Animal OR Models, Laboratory Animal OR Experimental Animal Models OR Animal Model, Experimental OR Animal Models, Experimental OR Experimental Animal Model OR Model, Experimental Animal OR Models, Experimental Animal OR Disease Models, Animal OR Animal Disease Model OR Animal Disease Models OR Disease Model, Animal) AND (Ligation OR Ligations OR Ligature OR Ligatures OR Injections OR Injection OR Injectables OR Injectable OR oral gavage OR gavage OR Administration, Oral OR Oral Administration OR Administrations, Oral OR Oral Administrations OR periodontal pathogens OR Gram-Negative Bacterial Infections OR Bacterial Infection, Gram-Negative OR Gram Negative Bacterial Infections OR Gram-Negative Bacterial Infection OR Infection, Gram-Negative Bacterial OR Bacterial Infections, Gram-Negative OR Infections, Gram-Negative Bacterial OR Coinfections OR Mixed Infection OR Infection, Mixed OR Infections, Mixed OR Mixed Infections OR Polymicrobial Infection OR Infection, Polymicrobial OR Infections, Polymicrobial OR Polymicrobial Infections OR Co-infection OR Co infection OR Co-infections OR Secondary Infections OR Infection, Secondary OR Infections, Secondary OR Secondary Infection OR Superinfections OR Superinvasion, Microbial OR Microbial Superinvasion OR Microbial Superinvasions OR Superinvasions, Microbial OR Host-Pathogen Interactions OR Host Pathogen Interactions OR Host-Pathogen Interaction OR Interaction, Host-Pathogen OR Interactions, Host-Pathogen OR Pathogen-Host Interactions OR Interaction, Pathogen-Host OR Interactions, Pathogen-Host OR Pathogen Host Interactions OR Pathogen-Host Interaction OR Host-Pathogen Relations OR Host Pathogen Relations OR Host-Pathogen Relation OR Relation, Host-Pathogen OR Relations, Host-Pathogen OR Chronic Inflammations OR Acute Inflammations OR Inflammations OR Innate Inflammatory Response OR Inflammatory Response, Innate OR Innate Inflammatory Responses OR Murine OR Mice OR Mus OR Mouse OR Mus musculus OR Mice, House OR House Mice OR Mouse, House OR House Mouse OR Mus domesticus OR Mus musculus domesticus OR domesticus, Mus musculus OR Mice, Laboratory OR Laboratory Mice OR Mouse, Laboratory OR Laboratory Mouse OR Mouse, Swiss OR Swiss Mouse OR Swiss Mice OR Mice, Swiss)
Estratégia de busca (Embase) **RESULTS: 646**	#1['periodontitis' OR 'periodontosis' OR 'pyorrhea alveolar' OR 'alveolar bone loss'], #2['biological model' OR 'disease model' OR 'experimental model' OR 'experimental periodontitis'], #3[ligation OR ligature OR 'administration of drugs, food and chemicals' OR 'gram negative infection' OR 'infections associated with other infections or conditions' OR 'polymicrobial infection' OR 'host pathogen interaction' OR

	'application site inflammation' OR 'injection site inflammation' OR 'chronic inflammation' OR 'inflammatory disease' OR 'mucosa inflammation' OR 'soft tissue inflammation'], #1 AND #2 AND #3
Estratégia de busca (Cochrane) **RESULTADOS: 66**	1 Cochrane Review matching (Periodontitis OR Periodontitides OR Pericementitis OR Pericementitides OR Disease, Periodontal OR Diseases, Periodontal OR Periodontal Disease OR Parodontosis OR Parodontoses OR Pyorrhea Alveolaris OR Alveolar Bone Losses OR Alveolar Process Atrophy OR Alveolar Process Atrophies OR Alveolar Resorption OR Alveolar Resorptions OR Resorption, Alveolar OR Resorptions, Alveolar OR Bone Loss, Periodontal OR Bone Losses, Periodontal OR Periodontal Bone Loss OR Periodontal Resorption OR Periodontal Resorptions OR Resorption, Periodontal OR Alveolar Bone Atrophy OR Alveolar Bone Atrophies OR Bone Atrophies, Alveolar OR Bone Atrophy, Alveolar OR Bone Loss, Alveolar OR interradicular bone loss OR interradicular bone) AND (Periodontal Disease Induction, Experimental Periodontitis OR Experimental Model OR Model, Experimental OR Models, Experimental OR Experimental Models OR Animal Model OR Animal Models OR Model, Animal OR Laboratory Animal Models OR Animal Model, Laboratory OR Animal Models, Laboratory OR Laboratory Animal Model OR Model, Laboratory Animal OR Models, Laboratory Animal OR Experimental Animal Models OR Animal Model, Experimental OR Animal Models, Experimental OR Experimental Animal Model OR Model, Experimental Animal OR Models, Experimental Animal OR Disease Models, Animal OR Animal Disease Model OR Animal Disease Models OR Disease Model, Animal) AND (Ligation OR Ligations OR Ligature OR Ligatures OR Injections OR Injection OR Injectables OR Injectable OR oral gavage OR gavage OR Administration, Oral OR Oral Administration OR Administrations, Oral OR Oral Administrations OR periodontal pathogens OR Gram-Negative Bacterial Infections OR Bacterial Infection, Gram-Negative OR Gram Negative Bacterial Infections OR Gram-Negative Bacterial Infection OR Infection, Gram-Negative Bacterial OR Bacterial Infections, Gram-Negative OR Infections, Gram-Negative Bacterial OR Coinfections OR Mixed Infection OR Infection, Mixed OR Infections, Mixed OR Mixed Infections OR Polymicrobial Infection OR Infection, Polymicrobial OR Infections, Polymicrobial OR Polymicrobial Infections OR Co-infection OR Co infection OR Co-infections OR Secondary Infections OR Infection, Secondary OR Infections, Secondary OR Secondary Infection OR Superinfections OR Superinvasion, Microbial OR Microbial Superinvasion OR Microbial Superinvasions OR Superinvasions, Microbial OR Host-Pathogen Interactions OR Host Pathogen Interactions OR Host-Pathogen Interaction OR Interaction, Host-Pathogen OR Interactions, Host-Pathogen OR Pathogen-Host Interactions OR Interaction, Pathogen-Host OR Interactions, Pathogen-Host OR Pathogen Host Interactions OR Pathogen-Host Interaction OR Host-Pathogen Relations OR Host Pathogen Relations OR Host-Pathogen Relation OR Relation, Host-Pathogen OR Relations, Host-Pathogen OR Chronic Inflammations OR Acute Inflammations OR Inflammations OR Innate Inflammatory Response OR Inflammatory Response, Innate OR Innate Inflammatory Responses OR Murine OR Mice OR Mus OR Mouse OR Mus musculus OR Mice, House OR House Mice OR Mouse, House OR House Mouse OR Mus domesticus OR Mus musculus domesticus OR domesticus, Mus musculus OR Mice, Laboratory OR Laboratory Mice OR Mouse, Laboratory OR Laboratory Mouse OR Mouse, Swiss OR Swiss Mouse OR Swiss Mice OR Mice, Swiss) in Title Abstract Keyword
Estratégia de busca (Scopus) **RESULTADOS: 2903**	(TITLE-ABS-KEY (periodontitis) OR TITLE-ABS-KEY (periodontosis) OR TITLE-ABS-KEY (pyorrhea AND alveolaris) OR TITLE-ABS-KEY (alveolar AND bone AND loss) AND TITLE-ABS-KEY (experimental AND periodontitis) OR TITLE-ABS-KEY (biological AND model) OR TITLE-ABS-KEY (disease AND model) OR TITLE-ABS-KEY (experimental AND model) OR TITLE-ABS-KEY (experimental AND periodontitis) AND TITLE-ABS-KEY (ligation) OR TITLE-ABS-KEY (ligature) OR TITLE-ABS-KEY (administration AND of AND drugs, AND foods AND chemical) OR TITLE-ABS-KEY (gram AND negative AND infection) OR TITLE-ABS-KEY (infections AND associated AND with AND other AND infections OR conditions) OR TITLE-ABS-KEY (polymicrobial AND infection) OR TITLE-ABS-KEY (host AND pathogen AND interaction) OR TITLE-ABS-KEY (application AND site AND inflammation) OR TITLE-ABS-KEY (injection AND site AND inflammation) OR TITLE-ABS-KEY (

	chronic AND inflammation) OR TITLE-ABS-KEY (inflammatory AND disease) OR TITLE-ABS-KEY (mucosa AND inflammation) OR TITLE-ABS-KEY (soft AND tissue AND inflammation)) AND (LIMIT-TO (DOCTYPE , "ar")) AND (LIMIT-TO (SUBJAREA , "DENT") OR LIMIT-TO (SUBJAREA , "IMMU")) AND (LIMIT-TO (SRCTYPE , "j"))
Estratégia de busca (Web of Science) **RESULTADOS: 1425**	TOPIC: ((Periodontitis OR Periodontitides OR Pericementitis OR Pericementitides OR Disease, Periodontal OR Diseases, Periodontal OR Periodontal Disease OR Parodontosis OR Parodontoses OR Pyorrhea Alveolaris OR Alveolar Bone Losses OR Alveolar Process Atrophy OR Alveolar Process Atrophies OR Alveolar Resorption OR Alveolar Resorptions OR Resorption, Alveolar OR Resorptions, Alveolar OR Bone Loss, Periodontal OR Bone Losses, Periodontal OR Periodontal Bone Loss OR Periodontal Resorption OR Periodontal Resorptions OR Resorption, Periodontal OR Alveolar Bone Atrophy OR Alveolar Bone Atrophies OR Bone Atrophies, Alveolar OR Bone Atrophy, Alveolar OR Bone Loss, Alveolar OR interradicular bone loss OR interradicular bone)) AND TOPIC: ((Periodontal Disease Induction, Experimental Periodontitis OR Experimental Model OR Model, Experimental OR Models, Experimental OR Experimental Models OR Animal Model OR Animal Models OR Model, Animal OR Laboratory Animal Models OR Animal Model, Laboratory OR Animal Models, Laboratory OR Laboratory Animal Model OR Model, Laboratory Animal OR Models, Laboratory Animal OR Experimental Animal Models OR Animal Model, Experimental OR Animal Models, Experimental OR Experimental Animal Model OR Model, Experimental Animal OR Models, Experimental Animal OR Disease Models, Animal OR Animal Disease Model OR Animal Disease Models OR Disease Model, Animal)) AND TOPIC: ((Ligation OR Ligations OR Ligature OR Ligatures OR Injections OR Injection OR Injectables OR Injectable OR oral gavage OR gavage OR Administration, Oral OR Oral Administration OR Administrations, Oral OR Oral Administrations OR periodontal pathogens OR Gram-Negative Bacterial Infections OR Bacterial Infection, Gram-Negative OR Gram Negative Bacterial Infections OR Gram-Negative Bacterial Infection OR Infection, Gram-Negative Bacterial OR Bacterial Infections, Gram-Negative OR Infections, Gram-Negative Bacterial OR Coinfections OR Mixed Infection OR Infection, Mixed OR Infections, Mixed OR Mixed Infections OR Polymicrobial Infection OR Infection, Polymicrobial OR Infections, Polymicrobial OR Polymicrobial Infections OR Co-infection OR Co infection OR Co-infections OR Secondary Infections OR Infection, Secondary OR Infections, Secondary OR Secondary Infection OR Superinfections OR Superinvasion, Microbial OR Microbial Superinvasion OR Microbial Superinvasions OR Superinvasions, Microbial OR Host-Pathogen Interactions OR Host Pathogen Interactions OR Host-Pathogen Interaction OR Interaction, Host-Pathogen OR Interactions, Host-Pathogen OR Pathogen-Host Interactions OR Interaction, Pathogen-Host OR Interactions, Pathogen-Host OR Pathogen Host Interactions OR Pathogen-Host Interaction OR Host-Pathogen Relations OR Host Pathogen Relations OR Host-Pathogen Relation OR Relation, Host-Pathogen OR Relations, Host-Pathogen OR Chronic Inflammations OR Acute Inflammations OR Inflammations OR Innate Inflammatory Response OR Inflammatory Response, Innate OR Innate Inflammatory Responses OR Murine OR Mice OR Mus OR Mouse OR Mus musculus OR Mice, House OR House Mice OR Mouse, House OR House Mouse OR Mus domesticus OR Mus musculus domesticus OR domesticus, Mus musculus OR Mice, Laboratory OR Laboratory Mice OR Mouse, Laboratory OR Laboratory Mouse OR Mouse, Swiss OR Swiss Mouse OR Swiss Mice OR Mice, Swiss))
Estratégia de busca (MedLine) **RESULTADOS: 0**	(Periodontitis OR Periodontitides OR Pericementitis OR Pericementitides OR Disease, Periodontal OR Diseases, Periodontal OR Periodontal Disease OR Parodontosis OR Parodontoses OR Pyorrhea Alveolaris OR Alveolar Bone Losses OR Alveolar Process Atrophy OR Alveolar Process Atrophies OR Alveolar Resorption OR Alveolar Resorptions OR Resorption, Alveolar OR Resorptions, Alveolar OR Bone Loss, Periodontal OR Bone Losses, Periodontal OR Periodontal Bone Loss OR Periodontal Resorption OR Periodontal Resorptions OR Resorption, Periodontal OR Alveolar Bone Atrophy OR Alveolar Bone Atrophies OR Bone Atrophies, Alveolar OR Bone Atrophy, Alveolar OR Bone Loss, Alveolar OR interradicular bone loss OR interradicular bone) AND (Periodontal Disease Induction, Experimental Periodontitis

	OR Experimental Model OR Model, Experimental OR Models, Experimental OR Experimental Models OR Animal Model OR Animal Models OR Model, Animal OR Laboratory Animal Models OR Animal Model, Laboratory OR Animal Models, Laboratory OR Laboratory Animal Model OR Model, Laboratory Animal OR Models, Laboratory Animal OR Experimental Animal Models OR Animal Model, Experimental OR Animal Models, Experimental OR Experimental Animal Model OR Model, Experimental Animal OR Models, Experimental Animal OR Disease Models, Animal OR Animal Disease Model OR Animal Disease Models OR Disease Model, Animal) AND (Ligation OR Ligations OR Ligature OR Ligatures OR Injections OR Injection OR Injectables OR Injectable OR oral gavage OR gavage OR Administration, Oral OR Oral Administration OR Administrations, Oral OR Oral Administrations OR periodontal pathogens OR Gram-Negative Bacterial Infections OR Bacterial Infection, Gram-Negative OR Gram Negative Bacterial Infections OR Gram-Negative Bacterial Infection OR Infection, Gram-Negative Bacterial OR Bacterial Infections, Gram-Negative OR Infections, Gram-Negative Bacterial OR Coinfections OR Mixed Infection OR Infection, Mixed OR Infections, Mixed OR Mixed Infections OR Polymicrobial Infection OR Infection, Polymicrobial OR Infections, Polymicrobial OR Polymicrobial Infections OR Co-infection OR Co infection OR Co-infections OR Secondary Infections OR Infection, Secondary OR Infections, Secondary OR Secondary Infection OR Superinfections OR Superinvasion, Microbial OR Microbial Superinvasion OR Microbial Superinvasions OR Superinvasions, Microbial OR Host-Pathogen Interactions OR Host Pathogen Interactions OR Host-Pathogen Interaction OR Interaction, Host-Pathogen OR Interactions, Host-Pathogen OR Pathogen-Host Interactions OR Interaction, Pathogen-Host OR Interactions, Pathogen-Host OR Pathogen Host Interactions OR Pathogen-Host Interaction OR Host-Pathogen Relations OR Host Pathogen Relations OR Host-Pathogen Relation OR Relation, Host-Pathogen OR Relations, Host-Pathogen OR Chronic Inflammations OR Acute Inflammations OR Inflammations OR Innate Inflammatory Response OR Inflammatory Response, Innate OR Innate Inflammatory Responses OR Murine OR Mice OR Mus OR Mouse OR Mus musculus OR Mice, House OR House Mice OR Mouse, House OR House Mouse OR Mus domesticus OR Mus musculus domesticus OR domesticus, Mus musculus OR Mice, Laboratory OR Laboratory Mice OR Mouse, Laboratory OR Laboratory Mouse OR Mouse, Swiss OR Swiss Mouse OR Swiss Mice OR Mice, Swiss)
Estratégia de busca (Lilacs) **RESULTADOS: 0**	(periodontitis OR periodontite OR periodontal diseases OR enfermedades periodontales OR doenças periodontais OR alveolar bone loss OR pérdida de hueso alveolar OR perda do osso alveolar) AND (models, animal OR modelos animales OR modelos animais OR disease models, animal OR modelos animales de endermedad OR modelos animais de doenças) AND (ligation OR ligadura OR injections OR inyecciones OR injeções OR injections, intramuscular OR inyecciones intramusculares OR injeções intramusculares OR injections, intraperitoneal OR inyecciones intraperitoneales OR injeções intraperitoneais OR injections, subcutaneous OR inyecciones subcutâneas OR injeções subcutâneas OR injections, intradermal OR inyecciones intradérmicas OR injeções intradérmicas OR administration, oral OR administración oral OR administração oral OR gram-negative bacterial infections OR infecciones por bacterias Gramnegativas OR infecções por bactérias Gram-negativas OR coinfection OR coinfección OR coinfecção OR superinfection OR sobreinfección OR superinfecção OR host-pathogen interactions OR interacciones huésped-patógeno OR interações hospedeiro-patógeno OR inflammation OR inflamación OR inflamação OR mice OR ratones OR camundongos)

Contagem total da pesquisa: 8,815

ANEXO 3. Artigo submetido na revista

JDR Clinical & Translational

JDR CLINICAL & TRANSLATIONAL RESEARCH

Local and systemic effects of different models of experimental periodontitis in mice.

Journal:	*JDR Clinical & Translational Research*
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Reviews
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Dal Acqua, Yasmin; University of Sao Paulo, Department of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology Hernandez Martinez, Cristhiam; University of Sao Paulo, Department of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology Fogacci, Mariana; Federal University of Pernambuco, Pernambuco-PE, Brazil., Department of Clinical and Preventive Dentistry, Division of Periodontics Barbirato, Davi; Federal University of Pernambuco, Pernambuco-PE, Brazil., Department of Oral & Maxillofacial Surgery Palioto, Daniela; Univerisity of Sao Paulo, Department of Oral & Maxillofacial Surgery and Periodontology
Keywords:	periodontitis induction, chronic periodontal disease, mouse models, ligature, gavage, alveolar bone resorption
Abstract:	Abstract: In periodontal research, animal models are used in order to investigate the host-bacterial interaction and to evaluate the etiopathogenesis of periodontitis. Considering the different models explored to date, which model would be more assertive for the objective proposed in each study? With this review, we approached the methodological differences and their different outcomes in an attempt to clarify any doubts and help the scientific community to more precisely chosen the most suitable model for the aim of the studied to be conducted. Objective: This systematic review aimed to summarize and compare the local and systemic impact of different models of experimental periodontitis in mice. Methods: A search was carried out on the PubMed, Embase, Scopus, Web of Science, Cochrane and LILACS databases for articles published in English until August 31, 2020. Inclusion and exclusion criteria were established. The data were collected on a purpose-made data extraction table for descriptive analysis. Results: The researchers identified 7 articles that met the inclusion criteria for the review. The most considered factors in the literature related to this topic were differences between experimental models of periodontitis in mice: ligature (LIG), gavage (GAV), LPS injection (i-LPS), bacteria-soaked ligature (LIGbact) and association between them. Bone loss and local and systemic inflammatory responses were the main parameters to be seek.

	Conclusion: Although most experimental models of periodontitis are efficient in causing alveolar bone loss, there are differences in their characteristics. In LIG, an acute process is established and the host tends to repair itself, decreasing the significance of this loss over time. When a bacterial challenge is added, bone loss appears to be significant with longer induction time, indicating the presence of a chronic condition. Thus, proving to be more promising models when the objective is to study the relationship between periodontitis and chronic systemic diseases.

SCHOLARONE™
Manuscripts