

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

**ESTUDO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO E PROFILÁTICO DE
N-ACETIL-CISTEÍNA NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA NA DOENÇA PERIODONTAL**

Leonardo Silveira Damasceno

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, MG

Fevereiro/2014

Leonardo Silveira Damasceno

**ESTUDO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO E PROFILÁTICO DE
N-ACETIL-CISTEÍNA NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA NA DOENÇA PERIODONTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para a obtenção do título de doutor em Biologia
Celular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Walderez Ornelas Dutra –
Departamento de Morfologia

Co-orientador: Prof. Dr Kenneth John Gollob – Instituto de
Ensino e Pesquisa – Hospital Santa Casa de Misericórdia

Belo Horizonte, MG

Fevereiro/2014

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Biologia das Interações Celulares, sob a orientação dos professores Walderez Ornelas Dutra e Kenneth John Gollob e contou com a colaboração dos seguintes pesquisadores:

Dra. Tarcília Aparecida da Silva, Departamento de Cirurgia Oral e Patologia, Faculdade de Odontologia / UFMG.

Dr. Celso Martins Queiroz-Junior, Departamento de Cirurgia Oral e Patologia, Faculdade de Odontologia / UFMG.

Dra. Mila Fernandes Moreira Madeira, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas/ UFMG.

Dra. Kristien Mortelmans, Departamento de Microbiologia, SRI International, Menlo Park.

Projeto parcialmente financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Agradecimento

Agradeço com muita ênfase:

À Profª Drª Walderez Ornelas Dutra, pela orientação e dedicação constantes, pelo ensinamento pessoal e profissional e pela oportunidade única confiada a mim. Muito obrigado por tudo, Wal.

Ao Prof Dr Kenneth J Gollob, pelo auxílio e ensinamento durante todo meu doutorado e neste projeto.

Ao colaborador e amigo Celso Martins Queiroz-Junior pela intensa dedicação nos experimentos.

Aos colaboradores deste projeto, Tarcília Aparecida da Silva e Mila Fernandes Moreira Madeira, fundamentais para o desenvolvimento do mesmo.

À Drª Kristien Mortelmans que abraçou o projeto e forneceu, com profissionalismo extremo, bases para os experimentos no doutorado sanduíche.

Às colegas de laboratório Érica Leandro Marciano Vieira e Daniela Valente Andrade por dividirmos momentos ímpares.

Aos demais colegas de laboratório Ju Villela, Tat, Dri, Carol, Luísa, Natália, Agostinho e Cris por inúmeros bons momentos e pelo incentivo e auxílio no desenvolvimento do projeto.

Aos demais professores do Laboratório de Biologia das Interações Celulares, Juliana, Paula, Micena e Rodolfo, pela ajuda incondicional.

Aos colegas da pós-graduação em biologia celular da UFMG, Paula Sales, Paulo Henrique, Guilherme e Fernando Mauad pela ajuda por várias vezes.

Ao aluno de iniciação científica Alan Sales pelo esforço nos experimentos iniciais.

À técnica de laboratório Kayla Veruska pelo auxílio na lida diária dentro do laboratório.

Aos demais colegas de laboratório, professores, alunos e funcionários da pós-graduação em biologia celular da UFMG.

A todos os meus amigos e conhecidos que dividiram comigo as alegrias, indecisões e decisões destes últimos 4 anos.

Agradeço especialmente:

Aos meus pais, Régia e Eden, pelo constante incentivo, amor e ajuda.

À minha filha Lis, que entendeu meus inúmeros momentos de ausência, mas que ao mesmo tempo, graças o seu sorriso, deu-me forças.

À minha avó Lygia pelo carinho.

Aos meus irmãos André e Ana que compreenderam a minha falta no cotidiano profissional.

Ao G.A.D.U. por dar LUZ aos meus caminhos. Fecha-se um ciclo.

Muito Obrigado a todos!!!

“Na vida, não há nada a temer, mas a entender”

Marie Curie

RESUMO

As doenças periodontais possuem, como componente principal e indutor, um biofilme bacteriano que se forma na superfície dos dentes em nível sub e supragengival. Periodontite é definida como uma inflamação gengival que afeta a integridade do suporte dentário. Estudos recentes estimam que 47,2% de indivíduos dos Estados Unidos da América têm algum tipo de periodontite. As principais bactérias periodontopatogênicas são: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Treponema denticola* (*T. denticola*) e *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*). Essas bactérias podem induzir uma resposta imune de caráter crônico e intenso. Está bem estabelecido que a imunidade é dependente de dois tipos de resposta imunológica: a mediada por células e a resposta humoral. Tem sido sugerido que a progressão da inflamação e perda óssea na doença periodontal seja devida a uma combinação de fatores como presença de bactérias periodontopatogênicas, elevados níveis de citocinas inflamatórias (i.e TNF- α , IL-1- β , IL-6 e IL-17), produção e ativação de MMPs e RANKL e relativos baixos níveis de citocina modulatória IL-10. A glutatona (GSH) é um tripeptídeo tiol encontrado livre no citosol que atua, principalmente, na redução de compostos reativos do oxigênio e nitrogênio. Além disso, GSH tem um importante papel na modulação das respostas imunológicas. Baixos níveis de GSH e estresse oxidativo têm sido relacionados a doenças crônicas. GSH participa do processamento de antígeno e altera o perfil de citocinas pela inibição de NF- κ B. N-acetil-cisteína (NAC) é uma variante acetilada de cisteína e é convertida em metabólitos capazes de estimular a síntese de GSH. NAC tem demonstrado diminuir perda óssea alveolar em ratos diabéticos e inibir expressão de citocinas inflamatórias em fibroblastos gengivais. Sendo assim, devido à importância do controle da resposta imune na doença periodontal e sabendo que NAC possui a capacidade de modular a resposta imune, que este estudo pretendeu avaliar os efeitos de NAC na modulação de características imunológicas e clínicas na doença periodontal. Para isto foi delineado um estudo envolvendo o tratamento de NAC em modelo experimental de doença periodontal em camundongos infectados com Aa e em sangue periférico proveniente de doadores saudáveis periodontalmente e estimulados com bactérias periodontais Aa, *P. gingivalis* e *T. denticola*. Foram realizadas análises para perda óssea alveolar, atividade de mieloperoxidase, quantificação de GSH em sangue periférico e análises para citocinas e marcadores de linfócitos e monócitos em linfonodo de camundongos e sangue periférico de humanos. Os resultados demonstraram que: 1- NAC diminui a perda óssea alveolar em animais infectados com bactéria periodontopatogênica; 2- NAC modula negativamente a atividade de mieloperoxidase em animais infectados; 3- NAC diminui o potencial para estresse oxidativo em sangue periférico de animais infectados; 4- NAC modula negativamente citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-17) e modula positivamente citocina regulatória (IL-10); 5- Em humanos, NAC é capaz de induzir

melhor ativação em linfócitos T CD8⁺ e linfócito TCD4⁺, bem como induzir a uma maior expressão de IFN- γ . Desta forma, NAC demonstrou ter um efeito modulatório na periodontite experimental e um ativador de linfócitos *in vitro* diante estímulo de bactérias periodontais, sendo um promissor agente local para prevenção e tratamento das doenças periodontais.

ABSTRACT

Periodontal diseases have as a main component and inductor a bacterial dental biofilm and are defined as an inflammation which affects the integrity of the dental tissues. Recent studies estimate that 47.2 % of individuals in the United States have some form of periodontitis. The main periodontopathic bacteria are: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Treponema denticola* (*T. denticola*) and *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*). These bacteria can induce a chronic and intense immune response. It is well established that immunity is dependent on two types of immune responses: cell mediated and humoral response. It has been suggested that the progression of inflammation and alveolar bone loss in periodontal disease is due to a combination of factors such as the presence of periodontal bacteria, elevated levels of inflammatory cytokines (e.g. TNF- α , IL -1 β , IL- 6 and IL-17), production and activation of MMPs and RANKL and relative low levels of modulatory cytokine IL-10. Glutathione (GSH) is a tripeptide thiol found free in the cytosol, with the ability to reduce reactive oxygen species and nitrogen compounds. Moreover, GSH plays an important role in the modulation of immune responses. Low levels of GSH and oxidative stress have been linked to chronic diseases. GSH participates in antigen processing and affects the profile of cytokines by inhibiting NF- κ B. N-acetylcysteine (NAC) is an acetylated cysteine variant that is converted into metabolites capable of stimulating the synthesis of GSH. NAC has been shown to decrease bone loss in diabetic rats and inhibit expression of inflammatory cytokines in gingival fibroblasts. Therefore, because of its importance in protecting rats to periodontal bone loss and knowing that NAC possess the ability to modulate the immune response, this study aims to assess the effects of NAC in the modulation of immunological and clinical characteristics in periodontal disease. Thus, a study involving NAC treatment in experimental periodontal disease in mice infected with Aa and in peripheral blood from healthy donors stimulated with periodontal periodontal bacteria Aa, *P. gingivalis*, and *T. denticola* was designed. We analyzed: 1- alveolar bone loss; 2- myeloperoxidase activity, 3- GSH quantification in peripheral blood, and 4- cytokines and markers for lymphocytes and monocytes activation in peripheral human blood. The results showed that: 1 - NAC reduces alveolar bone loss in animals infected with Aa; 2 - NAC negatively modulates the activity of myeloperoxidase in infected animals with NAC treatment; 3 - NAC decreases oxidative stress in the peripheral blood of infected animals; 4 - NAC negatively modulates proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-17) and positively modulates regulatory cytokine (IL - 10); 5 - in humans, NAC is able to enhance activity of CD8 + T lymphocytes. Thus, NAC showed a modulatory effect on experimental periodontitis in mice and an activating effect on human lymphocytes *in vitro* upon stimulation with periodontal bacteria. Together, these data suggest that NAC is a promising agent for the local prevention and treatment of periodontal diseases.

LISTA DE ABREVIATURAS:

Aa: Aggregatibacter actinomycetemcomitans

E. coli: Escherichia coli

P. gingivalis: Porphyromonas gingivalis

T. denticola: Treponema denticola

T. forsythia: Tannerella forsythia

BSO: butionina sulfoximina

FG: fibroblastos gengivais

FSG: fluído do sulco gengival

GSH: glutationa

IL-1 β : interleucina 1 beta

IL-2: interleucina 2

IL-4: interleucina 4

IL-5: interleucina 5

IL-10: interleucina 10

IL-13: interleucina 13

IL-17: interleucina 17

IFN- γ : interferon gama

LPS: lipopolissacárides

MMP-2: metaloproteinase de matriz 2

NAC: N-acetil-cisteína

PGE2: prostaglandina E2

ROS: compostos reativos do oxigênio

ST: sangue total

TGF- β : fator de crescimento transformante beta

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos moleculares nas doenças periodontais.....	25
Figura 2: Síntese de glutationa.....	32
Figura 3: Oxiredução de ROS e reciclagem de GSH	33
Figura 4: Perda óssea alveolar em camundongos	66
Figura 5: Atividade de mieloperoxidase em maxila de camundongos	68
Figura 6: Análise para citocina TNF-alfa em camundongos.....	69
Figura 7: Análise para citocina IFN-gama em camundongos	70
Figura 8: Análise para citocina IL-17 em camundongos.....	71
Figura 9: Análise para citocina IL-10 em camundongos.....	72
Figura 10: Análise GSH/GSSG em camundongos	74
Figura 11: Efeito de NAC em <i>Porphyromonas gingivalis</i>	76
Figura 12: Efeito de NAC em <i>Treponema denticola</i>	77
Figura 13: Efeito de NAC em <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	78
Figura 14: Análise de citometria de IMF para CD28 em CD4 ⁺ para <i>P gingivalis</i>	80
Figura 15: Análise citometria de IMF de CD28 em CD4 ⁺ em <i>T denticola</i>	80
Figura 16: Análise citometria IFM CD28 em CD4 ⁺ em 3 bactérias	81
Figura 17: Análise citometria IMF CD28 em CD8 ⁺ em <i>P gingivalis</i>	81
Figura 18: Análise citometria de CD8 ⁺ CD28 ⁺ em LPS <i>P gingivalis</i>	83
Figura 19: Análise citometria de IMF de CD28 em linfócitos em LPS de <i>P gingivalis</i>	84
Figura 20: Análise citometria de CD8 ⁺ IFN ⁺ em LPS de <i>P gingivalis</i>	85
Figura 21: Análise citometria IFN em CD8 ⁺ em LPS de <i>P gingivalis</i>	86

Figura 22: Análise citometria de IFN em linfócitos..... 87

LISTA DE QUADROS E TABELA

Quadro 1: Principais citocinas, fontes e suas funções	Erro! Indicador não definido.
Quadro 2: Efeitos de NAC em diversas doenças e/ou modelos de estudo	Erro! Indicador não definido.
Quadro 3: Desenho experimental.....	Erro! Indicador não definido.
Quadro 4: Anticorpos com os respectivos fluorocromos	61
Tabela 1: Razão entre IL-10/TNF-alfa.....	73

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido. 7
1.1- Considerações gerais sobre a doença periodontal	Erro! Indicador não definido.
1.2- A imunoregulação na doença periodontal	Erro! Indicador não definido.
1.3- A glutatona e o processo inflamatório periodontal.....	30
2- JUSTIFICATIVA	41
3- OBJETIVOS	44
3.1- Objetivo geral	44
3.2- Objetivos específicos	44
3.2.1 – Na infecção periodontal causada por <i>Aggregatibacter</i> <i>actinomycetemcomitans</i> , avaliar:.....	44
3.2.2 - Em doadores saudáveis periodontalmente.....	45
4- MATERIAL E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
4.1- Avaliação do uso de NAC em modelo experimental de periodontite	Erro! Indicador não definido.
4.1.1 Animais	Erro! Indicador não definido.
4.1.2 Indução da doença periodontal experimental	Erro! Indicador não definido.
4.1.3- Tratamento com NAC	51
4.1.4- Eutanásia	Erro! Indicador não definido.
4.1.5- Processamento do sangue periférico para análise de GSH	52
4.1.6- Processamento de linfonodo cervical para citometria de fluxo de citocinas IL-10, IL-6, TNF- α , IL-17 e IFN- γ	53
4.1.7- Processamento e análise de maxila para MPO e perda óssea alveolar	55
4.2- Estudo <i>in vitro</i> envolvendo sangue de pacientes saudáveis tratados ou não com NAC e infectados ou não com bactérias periodontopatogênicas viáveis	Erro! Indicador não definido.
4.2.1- Pacientes.....	Erro! Indicador não definido.
4.2.2- Cultura de bactérias periodontopatogênicas	58
4.2.3- Obtenção de células de sangue total	59
4.2.4- Infecção de sangue total com bactérias periodontopatogênicas	59

4.3- Estudo <i>in vitro</i> envolvendo sangue de pacientes saudáveis tratados ou não com NAC e infectados com LPS de <i>Porphyromonas gingivalis</i> :	62
4.3.1- Pacientes.....	62
5- ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
6- RESULTADOS.....	64
6.1- Em modelo experimental	64
6.1.2- Efeito do tratamento com NAC na perda óssea de camundongos submetidos ou não ao tratamento com NAC e infectados com Aa (Objetivo específico a).....	64
6.1.2- Efeitos de NAC sistêmico na atividade de MPO (Objetivo específico b):	67
6.1.3- Efeitos de NAC sistêmico na modulação de citocinas em linfonodo cervical de doença periodontal experimental (Objetivo específico c): Erro! Indicador não definido.	
6.1.4- Efeitos de NAC sistêmico em GSH total, GSH reduzida e GSSG em sangue periférico (Objetivo específico d):	73
6.2 Estudo <i>in vitro</i> do perfil de células de sangue total de doadores saudáveis periodontalmente infectados com bactérias periodontopatogênicas viáveis:	75
6.2.1- Efeitos diretos de NAC na proliferação, estabilidade ou morte nas colônias de Aa, <i>P. gingivalis</i> , <i>T. denticola</i> (objetivo específico e):	75
6.2.2- Efeitos de NAC <i>in vitro</i> na ativação e atividade funcional de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ pela expressão de moléculas marcadoras de ativação (HLA-DR, CD28, CTLA-4) e citocinas (IFN-gama, IL-17 e IL-10) perante estímulo com Aa, <i>P. gingivalis</i> , <i>T. denticola</i> (objetivo específico f):.....	78
6.2.3- Efeitos de NAC <i>in vitro</i> na ativação e atividade funcional de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ pela expressão de moléculas marcadoras de ativação (HLA-DR, CD28, CTLA-4) e citocinas (IFN-gama, IL-17 e IL-10) perante estímulo com LPS de <i>P. gingivalis</i> (objetivo específico g):.....	82
7- DISCUSSÃO	88
8- RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO.....	102
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104

16

10- ANEXOS 122

1- INTRODUÇÃO

1.1- Considerações gerais sobre a doença periodontal

O periodonto é um conjunto de estruturas que envolvem o dente, sendo constituído por tecidos duros (cimento e osso alveolar) e tecidos moles (gengiva e ligamento periodontal) que juntos promovem uma adequada função dos dentes (BARTOLD e NARAYANAN, 2006).

As doenças periodontais possuem, como componente principal e indutor, um biofilme bacteriano que se forma na superfície dos dentes em nível sub e supragengival. A inflamação gengival inicial induzida por este biofilme dental é denominada de gengivite. Esta se caracteriza pela presença de sinais clínicos gengivais como rubor e edema, sangramento provocado por contato, mudanças no contorno e consistência sem, contudo, haver perda de inserção dos tecidos periodontais (AAP, 2000). Periodontite é definida como uma inflamação gengival que afeta a integridade do suporte dentário pelo avanço do processo inflamatório e destruição dos tecidos periodontais de inserção (AAP¹, 2000). Periodontite pode ser crônica ou agressiva, sendo que esta última é, diferentemente da primeira, caracterizada, principalmente, por uma rápida perda de inserção e óssea, depósitos de biofilme bacteriano inconsistentes com a gravidade da destruição periodontal, anormalidades fagocitárias e a uma hiper ativação de macrófagos (ARMITAGE, 1999; LANG *et al.*, 1999). Além disso, a periodontite está relacionada à resposta imunológica do indivíduo e sua progressão, provavelmente,

é contínua com episódios curtos de exacerbação e remissão em sítios localizados (KINANE *et al.*, 2005). A descrição da prevalência das doenças periodontais é um tanto quanto variável nos estudos, podendo a periodontite crônica afetar entre 10 a 15% da população (PAPAPANOU *et al.*, 1999) e periodontite agressiva 5,2% em uma população brasileira (CORTELLI *et al.*, 2002). Entretanto, em um estudo recente, foi estimado que 47,2% de indivíduos dos Estados Unidos da América têm algum tipo de periodontite (EKE *et al.*, 2012). Também é consenso que a doença periodontal é a principal causa de perda dentária nos países desenvolvidos (VOS *et al.*, 2012).

Dentre as várias espécies bacterianas que colonizam o dente e suas estruturas de suporte, são considerados como principais patógenos periodontais o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Treponema denticola* (*T. denticola*) e *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) (AAP, 1996). Contudo, complexos bacterianos podem propiciar um espectro de relações com o hospedeiro que podem variar de benéficas a patogênicas (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2005). Estas ações patogênicas de microorganismos são dependentes de diversas substâncias como endotoxinas e LPS (lipopolissacáride) (VAN DYKE e SERHAN, 2003; KINANE *et al.*, 2005). O efeito destrutivo tecidual ocorre principalmente pela indução de uma resposta imunológica intensa produzida pelo organismo durante a liberação de mediadores químicos da inflamação como citocinas, peroxidases, proteases e ativador de reabsorção óssea, onde uma inadequada resolução ou falha ao retorno da

homeostase tecidual resulta na perpetuação da resposta inflamatória com consequente progressão da doença (PAGE e KORNMAN, 1997; VAN DYKE, 2008). Assim, mecanismos que possam auxiliar na manutenção ou estabelecimento da homeostase são fundamentais para a saúde periodontal.

1.2- A imunoregulação na doença periodontal

Está bem estabelecido que a imunidade depende de dois tipos de resposta imunológica: a mediada por células e a resposta humoral. O balanço entre estas é fortemente regulado por fatores associados a células apresentadoras de antígeno e a citocinas produzidas por células T CD4⁺ e células T CD8⁺ citotóxicas. Células T CD4⁺ podem ser divididas em subpopulações funcionalmente distintas, com base no seu perfil de produção de citocinas como as células T CD4⁺ Th1, Th2, Th17, Treg e Th3 (MOSMMAN e COFFMAN, 1989; HARRINGTON *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 1996, FUKAURA *et al.*, 1996). Células Th1 medeiam a resposta contra patógenos intracelulares e sintetizam principalmente IFN-gama e IL-2, possuindo uma relação importante na ativação de macrófagos. Células Th2 medeiam a resposta contra parasitas extracelulares e produzem principalmente IL-4, IL-5, e IL-13, possuindo uma relação importante na resposta imune humoral. Em humanos, tanto células Th1 como Th2 são produtoras de IL-10, citocina que medeia a auto-regulação da resposta nestas células. Linfócitos Th17 estão relacionados com um tipo de resposta imunológica patogênica contra bactérias extracelulares e fungos, assim como em doenças autoimunes, sintetizando principalmente IL-17 e

auxiliando na ativação de neutrófilos. Linfócitos Treg atuam regulando a resposta imune e sintetizam principalmente TGF- β e IL-10. Linfócitos Th3 são células que sintetizam TGF- β induzidas por tolerância oral (MOSMMAN e COFFMAN, 1989; HARRINGTON *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 1996, FUKAURA *et al.*, 1996). Células T CD8⁺ contêm principalmente grânulos citoplasmáticos com proteínas (granzimas e perforinas) que lisam células tumorais e infectadas com patógenos, liberando também, quando ativados, citocinas como IFN- γ e IL-10. Além disto, células T sob estímulo antigênico são capazes de liberar citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6. Desta forma, um amplo perfil de citocinas estão envolvidas com a resposta imune do hospedeiro (Quadro 1) (Modificado de ABBAS *et al.*, 2008).

Quadro 1: Principais citocinas, fontes e suas funções:

Citocina	Principais Fontes	Principais Funções
TNF-α	Macrófagos e linfócitos T ativados	Recrutamento de neutrófilos e monócitos, ativação de células endoteliais para expressão de moléculas de adesão endoteliais, ativação celular autócrina, indução de produção de quimiocinas, indução da produção de IL-1 β
IL-1β	Macrófagos, neutrófilos, células endoteliais e algumas células epiteliais	Ações semelhantes a TNF- α , atuando como importante mediador do processo inflamatório, envolvido na proliferação, diferenciação e apoptose celular. Ativa ciclooxigenase 2 ativando a cascata inflamatória por prostaglandinas
IFN-γ	Células NK, células NKT, células T CD4 ⁺ Th1 e células T CD8 ⁺	Ativa macrófagos e células NK, aumenta a expressão de MHC tipo I e tipo II em células apresentadoras de antígenos, aumenta atividade lisossomal de macrófagos, aumenta a diferenciação de células T Th1 por ativação de fator de transcrição T bet em células dendríticas,
IL-2	Linfócitos T CD4 ⁺	Atua na ativação e proliferação de linfócitos T. Aumenta a produção de IFN- γ e IL-4
IL-4	Células T CD4 ⁺ Th2	Atua na diferenciação e ativação de linfócitos T CD4 ⁺ Th2, troca de isotipo para IgE em linfócitos B. Inibe a ativação de macrófagos por

		IFN- γ
IL-6	Macrófagos, células T, células endoteliais e fibroblastos	Induz na produção de mediadores do processo inflamatório, produção de neutrófilos e atua na diferenciação de osteoclastos. Atua de forma anti-inflamatória mediando a inibição de TNF- α e IL-1 β , bem como ativando IL-10
IL-10	Macrófagos e células T	Inibe a produção de IL-12, diminuindo a secreção de IFN- γ e, por conseguinte, a ativação de macrófagos. Inibe a expressão de MHC tipo II e moléculas co-estimulatórias em macrófagos
IL-17	Células T	Induz a produção de quimiocinas e citocinas no recrutamento de neutrófilos. Atua sinergicamente na indução de outras citocinas inflamatórias, como IL-6, TNF- α e IL-1 β .

Quadro 1- Principais citocinas envolvidas na resposta imune com suas principais fontes produtoras e principais funções envolvidas no processo inflamatório.

Os linfócitos T desempenham papéis centrais em todas as respostas imunológicas adquiridas contra antígenos proteicos. Na imunidade celular, as células T CD4⁺ ativam macrófagos para destruir microorganismos fagocitados. Linfócitos T CD8⁺ destroem as células infectadas por microorganismos intracelulares. Estas células T respondem a antígenos peptídicos que são expostos pelas células apresentadoras de antígeno. Nas células apresentadoras de antígeno os resíduos antigênicos são montados em complexo principal de histocompatibilidade (MHC), externalizados na membrana celular e apresentados para as células T. O MHC pode ser do tipo I, em que expõem antígenos proteicos do citosol, e tipo II, em que expõem antígenos proteicos extracelulares. Linfócitos T CD4⁺ reconhecem peptídeos via MHC tipo II e linfócitos T CD8⁺ reconhecem peptídeos via MHC tipo I (ABBAS *et al.*, 2008). Durante a sinapse imunológica, o receptor de células T (TCR) presente em sua superfície celular reconhece os peptídeos apresentados pelo MHC. A transdução intracelular do sinal e ativação

da célula T se dá por uma série de moléculas de superfície associadas pertencentes ao complexo TCR, como CD3 e cadeia ζ . CD4 e CD8 também fazem parte do complexo TCR e atuam como co-receptores do MHC (CD4 para MHC de classe II e CD8 para MHC de classe I) e transduzem os sinais durante a ativação das células T. Para uma ativação efetiva das células T é necessário um segundo sinal desencadeado por moléculas de superfície co-estimuladoras, como o CD28. CD28 está presente em cerca de 90% de linfócitos T CD4⁺ e liga-se a moléculas co-estimulatórias de células apresentadoras de antígeno (B7-1 ou CD80 e B7-2 ou CD86). A ligação de CD80/CD86 a CD28 induz a expressão de proteínas antiapoptóticas e outras que promovem a diferenciação e proliferação das células T. CTLA-4 é uma molécula homóloga a CD28, expressa por células T CD4⁺ e CD8⁺ recentemente ativadas, inibindo a os sinais liberados por CD28. Desta forma, tanto a diminuição de CD28 quanto o aumento da expressão de CTLA-4 estão relacionados a uma ativação de células T (ABBAS *et al.*, 2008).

Após o acúmulo bacteriano de quatro a oito dias na superfície dental, o processo inflamatório se desenvolve levando a um quadro de gengivite precoce, com 15% do volume do tecido conjuntivo gengival ocupado pelo infiltrado inflamatório, sendo composto principalmente por neutrófilos, macrófagos e linfócitos T. Na doença periodontal estabelecida, o infiltrado inflamatório é composto principalmente por linfócitos B e plasmócitos (KINANE *et al.*, 2005).

Desta forma, a patogênese da doença periodontal envolve uma resposta imune inata e adaptativa. Contudo, periodontite crônica e periodontite agressiva

demonstram um aspecto de processo inflamatório crônico (GRAVES, 2008). Tem sido estabelecida uma relação entre o desenvolvimento de doenças periodontais, destruição óssea e bactérias periodontopatogênicas (LOE, 1986), entretanto isto não é suficiente para iniciar a doença, pois a destruição dos tecidos periodontais é dependente de uma desregulada e persistente resposta imune do hospedeiro (GRAVES, 2008).

Os mecanismos moleculares envolvidos na destruição dos tecidos de proteção e sustentação nas doenças periodontais são complexos, pois envolvem uma série de mediadores inflamatórios, proteases e peroxidases (MPO-mieloperoxidase) e ativação de osteoclastos. Metaloproteinases de matriz (MMP) são uma série de proteases relacionadas com a remodelação dos tecidos moles (VERSTAPPEN e VON DEN HOFF, 2006). Tem sido demonstrado que tecidos periodontais inflamados demonstram alteração no padrão entre MMPs e TIMPs (inibidores teciduais de matriz de metaloproteinases) (GARLET *et al.*, 2004). Em fibroblastos gengivais, IL-1- β e TNF- α são capazes aumentar a síntese de MMP-1 (colagenase) e MMP-2 (gelatinase). Osteoblastos, sob estímulo da citocina IL-6, aumentam a síntese de MMP-2, bem como de MMP-13 sob o estímulo de IL-1 β e TNF- α (GRAVES 2008).

Aliada a destruição do tecido conjuntivo propriamente dito, a destruição do osso alveolar é fundamental para a progressão da doença periodontal. A manutenção do osso alveolar é dependente do equilíbrio entre reabsorção (por osteoclasto) e aposição (por osteoblasto) óssea. O principal mecanismo que

regula a atividade de osteoclasto ocorre através do receptor RANK (receptor ativador de NF- κ B), o seu ligante RANKL e a sua contraparte solúvel OPG (osteoprotegerina). RANKL se liga ao receptor RANK, presente em pré-osteoclastos maturando-os e ativando-os. Ao contrário, OPG atua competindo pela ligação com o receptor RANK inibindo a ativação osteoclástica (LEIBBRANDT e PENNINGER, 2008). Várias células presentes no tecido periodontal expressam RANKL sob estímulo, como osteoblastos, linfócitos T e linfócito B (GARLET, 2010). Tem sido demonstrado que IL-1 β estimula a osteoclastogênese e a reabsorção óssea pelo aumento da expressão de RANKL, bem como TNF- α estimula a osteoclastogênese de forma indireta (induzindo IL-1 β) e direta (induzindo RANKL) (WEI *et al.*, 2005). Também, a citocina pró-inflamatória IL-17 é descrita como indutor de RANKL em humanos (SATO *et al.*, 2006). Em contrapartida, em camundongos humanizados infectados com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a introdução de OPG reduziu a osteoclastogênese bem como inibiu a perda óssea alveolar (TENG, 2002). Porém, a infecção gengival de ratos com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induz a produção de RANKL por células B, na ausência de linfócitos T, contribuindo para a perda óssea alveolar (HAN *et al.*, 2006). Entretanto, tanto a presença de linfócitos Th1 quanto linfócitos Th2 estão relacionados com perda óssea alveolar e níveis alterados de RANKL (TENG, 2002). De fato, elevados níveis de RANKL em tecidos com doença periodontal (GARLET *et al.*, 2004) bem como o balanço de RANKL/OPG está relacionado com perda óssea alveolar e progressão da doença

em periodontite experimental (GARLET *et al.*, 2006). Sendo assim, os componentes moleculares da doença periodontal dependem da ação de células e mediadores inflamatórios que induzem a produção alterada de proteases como metaloproteinases que degradam a matriz extracelular e de RANKL que ativa osteoclastos para a destruição do osso alveolar (Figura 1).

Figura 1: Mecanismos moleculares nas doenças periodontais:

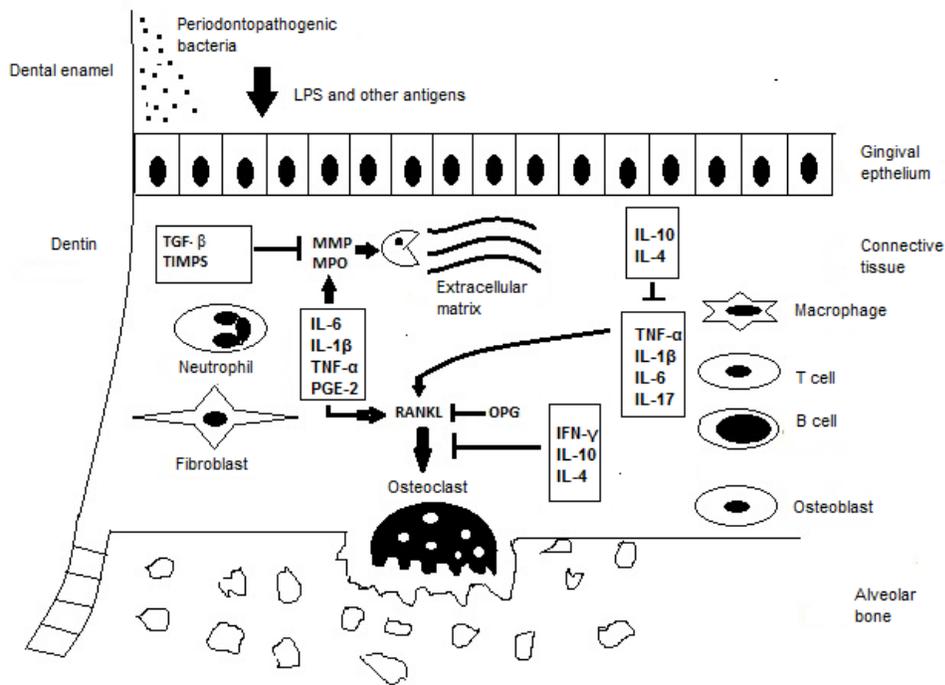


Figura 1- Citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-17 produzidas por diversos tipos celulares podem induzir uma quebra no equilíbrio de RANKL, ativando osteoclastos e promovendo a reabsorção óssea. Citocinas como IFN- γ , IL-10 e IL-4 são

capazes de controlar a produção direta ou indiretamente de RANKL, diminuindo a ativação osteoclástica. Também, alteração no balanço de citocinas inflamatórias e PGE-2 são capazes de induzir a destruição da matriz extracelular por meio de MMPs e MPO. TIMPs e TGF-beta podem controlar a destruição da matriz extracelular.

Estudos recentes têm focado no entendimento de como a quebra no equilíbrio da resposta do hospedeiro acarreta no início e desenvolvimento da destruição periodontal.

Antígenos bacterianos são essenciais para a indução da imunidade inata pelos receptores tipo Toll (TLR). A ativação por TLRs leva a uma cascata intracelular que promove a ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear κ B (NF κ B) e proteína ativadora 1 (AP-1). Estes fatores induzem a síntese de vários mediadores do processo inflamatório como citocinas e quimiocinas (SURESH e MOSSER, 2013). Antígenos das principais bactérias relacionadas com periodontites, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*, ativam resposta imune inata via TLR-2 e TLR-4 (GARLET, 2010). Células epiteliais gengivais expressam constitutivamente TLR-2 e baixos níveis de TLR-4. TLR-2 parece contribuir para a um aumento na produção de IL-8 por células do epitélio gengival em resposta a *Porphyromonas gingivalis* (ASAI *et al.*, 2001). Também, fibroblastos gengivais expressam constitutivamente RNAm de TLR-2 e TLR-4, bem como CD14 (um co-receptor de LPS) (WANG e DONG, 2003). Interessantemente, altos níveis de RNAm de TLR-2, TLR-4 e CD14 foram observados em fibroblastos gengivais de pacientes com periodontite quando

comparado com pacientes saudáveis (WANG e DONG, 2003). Resultados similares foram observados *in vitro* com estímulo por LPS de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Entretanto, LPS de *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* possuem habilidade diferenciada para induzir resposta imune inata. Células dendríticas derivadas de monócitos humanos estimulam a diferenciação de linfócitos Th1 via aumento da síntese de IL-12 na presença de LPS de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Em contraste, LPS de *Porphyromonas gingivalis* estimula células dendríticas na diferenciação de linfócitos Th2, aumentando a síntese de IL-10 e diminuindo IL-12 (MAHANONDA e PICHYANGKUL, 2007). Desta forma, parece que antígenos bacterianos podem amplificar o processo inflamatório aumentando a síntese de citocinas pró-inflamatórias via NF- κ B, promovendo o delineamento da resposta imune adaptativa.

Assim, fica claro que, além da resposta imune inata, bactérias periodontais mobilizam uma resposta imune adaptativa. Após o reconhecimento de antígenos bacterianos, células apresentadoras de antígeno expressam moléculas co-estimulatórias e padrões específicos de citocinas na sinapse imunológica que polariza e ativa linfócitos antígeno-específico (GARLET, 2010). Tanto bactérias periodontais como bactérias comensais são capazes de induzir uma resposta polarizada para linfócitos T Th1, Th2 e Th17 (GEMMELL *et al.*, 2002; GARLET, 2010).

IFN- γ é a citocina de assinatura do perfil de linfócitos Th1. Estudos têm correlacionado elevados níveis de IFN- γ em tecidos periodontais com doença periodontal progressiva ou periodontite grave (APPAY *et al.*, 2008) bem como em reabsorção óssea induzida por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em modelos animais (BAKER *et al.*, 1999; GARLET *et al.*, 2008). Entretanto, lesões ósseas são protegidas por IFN- γ , desde que esta citocina regula positivamente a diferenciação osteoblástica via STAT1, um receptor para este tipo de IFN. Além disto, IFN- γ atua regulando negativamente RANKL por meio de uma proteína adaptadora e, conseqüentemente, inibindo a osteoclastogênese (TAKAYANAGI *et al.*, 2005; DANKS e TAKAYANAGI, 2013). Também, segundo Gemmell *et al.* (2007), a resposta imune em tecidos periodontais mediada por células T de perfil Th1 estão associadas com lesões estáveis ao passo que resposta mediada por perfil Th2 está associada com progressão da doença. De fato, é interessante observar que IFN- γ é essencial para ativação de macrófagos e destruição bacteriana por uma resposta imune efetiva. Camundongos nocaute para IFN- γ e infectados com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* são acometidos por infecção letal (GARLET *et al.*, 2008). Além disto, em modelo murino, *Tannerella forsythia* ativa TLR-2 em células apresentadoras de antígeno polarizando uma resposta Th2 pelo aumento de IL-5 e não IFN- γ , o que foi correlacionado com um aumento da perda óssea alveolar (MYNENI *et al.*, 2011). Então, IFN- γ parece ter uma relação controversa entre promover a estabilidade ou induzir a doença periodontal.

Linfócitos T produtores de IL-17 têm sido relacionados com destruição óssea e aumento da expressão de RANKL em camundongos e em humanos com artrite reumatoide (SATO *et al.*, 2006). Apesar de IL-17 não aumentar diretamente de forma significativa MMP, esta citocina pode amplificar o processo inflamatório elevando os níveis de IL-6 e então elevar níveis de TNF- α e IL-1 β , acarretando em aumento da produção de MMPs e RANKL (BEKLEN *et al.*, 2007). Recentemente, um estudo demonstrou elevados níveis de RNAm de IL-17, uma citocina sintetizada por linfócitos Th17, em tecidos gengivais com periodontite crônica de humanos (CARDOSO *et al.*, 2009).

Alguns estudos em humanos e em modelos animais apontaram um padrão similar de resposta Th1 e Th2 (PETIT *et al.*, 2001; BERGLUNDH *et al.*, 2002). Entretanto, em tecidos gengivais inflamados, uma predominância de citocinas de perfil Th2 pode induzir a uma resposta por células B (YAMAMOTO *et al.*, 1997). Além disto, células B são produtoras de RANKL e tecidos periodontais inflamados em lesões estabelecidas apresentam níveis elevado de linfócitos B, sendo a maioria marcada para RANKL⁺ (HAN *et al.*, 2009; KAWAI *et al.*, 2006). Em modelo murino infectado com *Porphyromonas gingivalis*, a deleção de células B preveniu a perda óssea (BAKER *et al.*, 2009). Em um estudo avaliando biopsias de pacientes com periodontite agressiva a soma total de células CD3⁺ foi significativamente baixa em relação à soma total de células mononucleares (33% contra 61,1% em pacientes saudáveis). A presença de células CD4⁺ também foi baixa quando comparado com pacientes sem periodontite (8,5% contra 29,2% em

pacientes sadios) (SUÁREZ *et al.*, 2004). Gemmell *et al.* (2006) demonstraram, em camundongos, que *Porphyromonas gingivalis* suprimiu a resposta por linfócitos T por vários caminhos, incluindo a diminuição na expressão de genes de receptores do complexo CD3 e expressão de CD8. Sendo assim, parece existir, na periodontite, uma inabilidade de sustentar uma resposta imune mediada por células Th1, podendo favorecer a progressão da doença (GAFFEN e HAJISHENGALLIS, 2008). Tendo em vista que a doença periodontal possui uma resposta imunológica complexa, parece que uma quebra no equilíbrio desta resposta imune pode contribuir para o início e progressão do dano periodontal (GEMMELL *et al.*, 2007). Além disto, a resposta imune do hospedeiro parece ser dependente do perfil bacteriano (GEMMELL *et al.*, 2007; GAFFEN e HAJISHENGALLIS, 2008).

1.3- A glutatona e o processo inflamatório periodontal

A glutatona (GSH) é um tripeptídeo tiol encontrado livre no citosol de todas as células animais, sendo constituída por três aminoácidos não essenciais: o ácido glutâmico, a glicina e a cisteína (MEISTER, 1994). Encontra-se presente em elevadas concentrações intracelulares (0,1-10mM) e é o tiol mais prevalente nas células. GSH foi adaptada por processos evolutivos para realizar uma diversa gama de importantes funções celulares. Sua principal função está relacionada com a manutenção de um adequado potencial de oxirredução celular, reduzindo compostos reativos do oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS). Ela também participa

da catálise, metabolismo e transporte intracelular, e nas de reações que envolvem a síntese proteica e de ácidos nucleicos (DRÖGE *et al.*, 1994). Além disto, GSH tem um importante papel na modulação das respostas imunológicas. Desta forma, baixos níveis de GSH e estresse oxidativo têm sido relacionados a doenças crônicas e AIDS (MEISTER, 1994; DRÖGE e BRETKREUTZ, 2000; RAHMAN e MACNEE, 2000).

GSH é sintetizada no interior das células. A sua síntese irá variar de acordo com a biodisponibilidade dos aminoácidos, principalmente a cisteína, uma vez que é o aminoácido mais escasso dentre os três nos alimentos. A cisteína possui uma molécula de enxofre que forma o grupo tiol, ao qual a diferencia bioquimicamente e a capacita para exercer sua atividade antioxidante. GSH é sintetizada em duas etapas consecutivas. A γ -glutamilcisteína sintase (GSC) usa o glutamato e a cisteína como substratos para formar o dipeptídeo γ -glutamilcisteína ao qual combina com a glicina em uma reação catalisada pela glutatona sintetase (GS), gerando GSH reduzida (GSH ou rGSH), consumindo duas moléculas de ATPs (Figura 2) (MEISTER, 1994).

Figura 2: Síntese de glutatona:

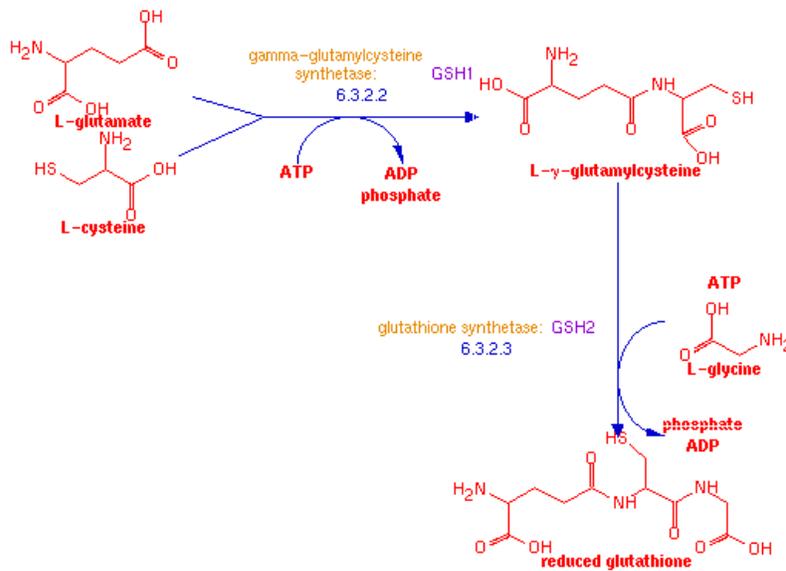


Figura 2- A síntese de glutatona ocorre em duas fases: glutamato e cisteína são unidos por γ -glutamylcisteína sintetase com um gasto de ATP. Posteriormente, glutatona sintetase adiciona glicina com gasto de um ATP, originando glutatona reduzida. (Fonte: http://www.bio.davidson.edu/genomics/2006/martens/favorite_gene.html).

GSH atua na oxirredução de ROS por catálise enzimática utilizando a glutatona peroxidase (GPx) ou quimicamente. Sendo assim, GPx, une duas moléculas de rGSH capturando um átomo de oxigênio de ROS e liberando uma molécula de água, formando a glutatona oxidada (GSSG). GSSG é reciclada em rGSH por meio da catálise realizada por glutatona redutase e de NAPH com doação de um elétron. (Figura 3) (MEISTER, 1994).

Figura 3: Oxiredução de ROS e reciclagem de GSH:

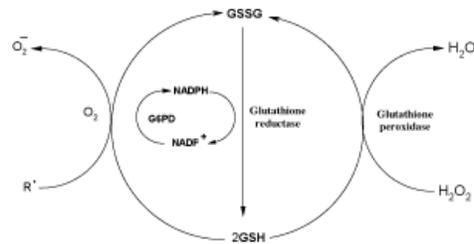


Figura 3- Duas moléculas de glutatona são necessárias para a redução de ROS. A reciclagem de glutatona ocorre pela ação de glutatona redutase via doação de um elétron por NADPH. (Fonte: <http://nwlss.com/products/pdf/gsh01gssgapp051712.htm>).

As alterações no metabolismo da glutatona estão relacionadas com estresse oxidativo. Em tecidos saudáveis a maior parte da GSH está em sua forma reduzida. Assim, em situações patológicas, um aumento de GSSG indica um falta de balanço redox celular (DROGE e BRETKEUTZ, 2000).

Os níveis intracelulares GSH são relacionados com a resposta imune do hospedeiro. GSH participa ativamente no processamento de antígeno em células apresentadoras de antígeno. A redução de pontes dissulfídicas em lisossomos, essencial para a degradação de antígenos externos microbianos, é orquestrada pela capacidade de oxirredução de GSH, sendo um dos primeiros passos no processamento de antígenos. Também, a deficiência genética de GSH (oxoprolinuria) ou adquirida (sepse, AIDS) leva a uma maior dificuldade de controle de infecções bacterianas (MORRIS *et al.*, 2013). Aumento nos níveis de GSH promove a uma distribuição de citocinas inicialmente moduladas para uma

resposta imune do tipo Th1 (PETERSON *et al.*, 1998; VERHASSELT *et al.*, 1999). Tratamento *in vitro* de sangue total com N-acetil cisteína (NAC), uma substância capaz de elevar os níveis de GSH, seguido de infecção com *Mycobacterium tuberculosis*, demonstrou um aumento significativo na produção de IFN- γ , o que levou a um melhor controle desta bactéria por macrófagos (VERHASSELT *et al.*, 1999). O mecanismo que GSH altera o perfil de citocinas é devido a depleção de ROS, o que leva a manter NF- κ B sequestrado por I κ B, não estando disponível para translocação nuclear e ativação de genes de citocinas. Também, NAC é capaz de inibir NF- κ B em células apresentadoras de antígeno desafiadas ou não por LPS (MORRIS *et al.*, 2013).

Uma diminuição da ativação de neutrófilos humanos pôde ser observada utilizando-se uma enzima inibitória da síntese de glutatona (BSO-butionina sulfoximina), induzindo a uma depleção acelerada de GSH (BILZER e LAUTERBURG, 1991). Da mesma forma, para demonstrar a relação de GSH na ativação de linfócitos, Hamilos e Wedner (1985) suprimiram GSH intracelular utilizando BSO. Linfócitos com depleção de GSH demonstraram ativação parcial. A transformação blástica total nestes linfócitos só foi evidenciada após o restabelecimento dos níveis de GSH. Entretanto, tanto a presença de níveis não detectáveis quanto de níveis elevados de GSH intracelular pode interferir na proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de pacientes suplementados ou não com NAC (KINSCHERF *et al.*, 1994).

N-acetil-cisteína (NAC) é uma variante acetilada de cisteína e é convertida em metabólitos capazes de estimular a síntese de GSH. A resposta proliferativa e atividade de linfócitos, bem como a ativação de macrófagos, são fortemente influenciadas por pequenas variações de concentrações de cisteína extracelular e também por concentrações aproximadamente fisiológicas e elevadas (DRÖGE *et al.*, 1991; ROCHA-VIEIRA *et al.*, 2003; KATO *et al.*, 2008). Sendo assim, estratégias terapêuticas visando o aumento dos níveis intracelulares de GSH utilizando-se NAC na prevenção e tratamento de doenças têm sido propostas (Quadro 2).

Quadro 2: Efeitos de NAC em diversas doenças e/ou modelos de estudo:

Modelo/Doença	Hospedeiro	Achados	Referencias
Doença pulmonar obstrutiva crônica	Humano	NAC diminui a destruição pulmonar	Stiks <i>et al.</i> , 1992
Expressão de TNF- α	Camundongo	NAC protegeu contra toxicidade de LPS e inibe o aumento dos níveis de TNF- α em camundongos infectados com LPS	Peristeris <i>et al.</i> , 1992
Fagocitose bacteriana	Humano	NAC melhorou a atividade bactericida de macrófagos e neutrófilos alveolares. Além disto, NAC protegeu a morte destas células.	Oddera <i>et al.</i> , 1994
HIV	Humano	Suplementação oral com NAC restaurou os níveis de GSH e melhorou a sobrevida.	Herzenberg <i>et al.</i> , 1997
Influenza	Humano	NAC oral diminui os sintomas clínicos na infecção por influenza e melhorou a imunidade mediada por células durante as epidemias por influenza.	De Flora <i>et al.</i> , 1997
Ativação de linfócitos	Camundongo	NAC restaurou os níveis de	Peterson <i>et al.</i> ,

T		GSH e a resposta por citocinas do perfil Th1 após depleção de GSH.	1998
Doença de Chagas	Camundongo	NAC mostrou um efeito protetivo contra os efeitos de <i>Trypanosoma cruzi</i> restaurando parcialmente o padrão CD4/CD8.	Guevara <i>et al.</i> , 2000
HIV	Humano	Suplementação com NAC oral aumentou a atividade de células NK.	Breitkreutz <i>et al.</i> , 2000
Infecção por <i>Leishmania major</i>	Camundongo	NAC levou a uma diminuição na lesão em animais	Rocha-Vieira <i>et al.</i> , 2003
Fibrose pulmonar idiopática	Humano	NAC diminuiu a deterioração da função pulmonar após um ano de tratamento.	Demedts <i>et al.</i> , 2005
Adesão de leucócitos	Humano	NAC atenua o aumento da expressão de CD11b estimulado por LPS ou IL-8.	Nandate <i>et al.</i> , 2005
Pancreatite aguda	Ratos	NAC reduziu a injúria pancreática e aumentou a produção de IL-10 em células acinares.	Ramudo <i>et al.</i> , 2005
Resposta imune	Fibroblastos gengivais humanos	NAC suprimiu citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α induzidas por LPS	Kim <i>et al.</i> , 2007
Injúria por reperfusão isquêmica	Porcos	NAC reduziu a reação inflamatória durante a fase isquêmica.	Goudens <i>et al.</i> , 2008
Parto prematuro	Ratos	Pretreatmento com NAC diminuiu os efeitos inflamatórios de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , prostaglandina-2 e cyclooxygenase-2 induzida por LPS em placenta.	Paintlia <i>et al.</i> , 2008
Perda óssea alveolar	Ratos	NAC sistêmico diminuiu a perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratos diabéticos	Toker <i>et al.</i> , 2009
Fibrose cística	Humano	NAC aumentou GSH celular em expectoração induzida.	Dauletbaev <i>et al.</i> , 2009
Diabetes mellitus tipo II	Humano	Oral NAC therapy decreased c-reactive	Jeremias <i>et al.</i> , 2009

		protein levels	
Heterogeneous bone graft	Ratos	NAC melhorou a regeneração óssea usando biomateriais inorgânicos.	Yamada <i>et al.</i> , 2010
Cicatrização de tecido duro	Ratos	NAC recuperou fibroblasto gengival e preveniu a supressão de atividade fosfatase alcalina em cultura bacteriana.	Yamada <i>et al.</i> , 2011
Estresse oxidativo em osteoclastos	Ratos	NAC restaurou a expressão gênica de colágeno tipo I, osteopontina e osteocalcina.	Ueno <i>et al.</i> , 2011
Injúria cerebral	Ratos	NAC previniu a translocação nuclear de NF-kB e injúria inflamatória por IL-1 β , IL-6 e TNF- α	Thakurta <i>et al.</i> , 2012
Injúria inflamatória fetal	Ratos	NAC materno atenua IL-6 e TNF- α induzido por LPS em líquido amniótico e limitou a infiltração de leucócitos e expressão de quimiocinas induzida por LPS na placenta.	Beloosisky <i>et al.</i> , 2012
Regeneração óssea	Ratos	NAC acelerou a regeneração óssea.	Yamada <i>et al.</i> , 2013
Tumorigênese	Camundongo	NAC diminuiu a proliferação provavelmente pela inibição da sinalização de MAPKs e NF-kB.	Pal <i>et al.</i> , 2013
Regeneração da matriz extracelular	Ensaio enzimático	NAC inibiu hialuronidase	Sunitha <i>et al.</i> , 2013
Dano oxidativo em DNA	Humano	NAC reduziu o dano oxidativo de DNA em células T CD4.	Marthandan <i>et al.</i> , 2013

Quadro 2- Revisão do uso de NAC em várias doenças e modelos experimentais com significância clínica e/ou laboratorial.

Peterson *et al.* (1998), avaliando os efeitos da depleção de GSH em camundongos, demonstraram que esta depleção inibiu a produção de citocinas associadas a Th1, favorecendo a resposta com citocinas associadas a Th2.

Contudo, após restaurar os níveis de GSH com NAC houve um retorno ao padrão de resposta Th1 naquele modelo de estudo.

Segundo Kato *et al.* (2008), repetidas infecções com *Porphyromonas gingivalis* em cavidade peritoneal de camundongos não aumentam os níveis de GSH e mantém um estado Th2 dominante, atrasando desta forma a eliminação de *Porphyromonas gingivalis*. Além disso, o aumento dos níveis de GSH demonstrou um aumento na eliminação bacteriana, possivelmente pelo aumento dos níveis de IFN-gama que por si ativam macrófagos.

O papel de NAC na modulação da resposta imune em doenças parasitárias tem sido estudado por nosso grupo. Avaliando a histopatologia de lesões em camundongos susceptíveis a leishmaniose ingerindo doses diárias de NAC antes de serem infectados, Rocha-Vieira *et al.* (2003) observaram que por 11 semanas houve uma alta frequência de células produzindo IFN-gama e TNF- α em camundongos tratados com NAC, induzindo a uma melhor resposta imune pela ativação mais eficiente de macrófagos, sem haver, contudo, uma mudança de perfil de resposta imune de Th2 para Th1. Esses animais tiveram um retardo no desenvolvimento de lesão, sugerindo um papel parcialmente protetor para NAC naquele modelo.

Em modelos associados à doença periodontal, o papel de NAC também tem sido estudado. Kim *et al.* (2007) avaliaram a expressão de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e MMP-2 induzidos por LPS de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* na ausência ou na presença de NAC em cultura de

fibroblastos gengivais (FG). Os resultados demonstraram que FG tiveram níveis significativamente aumentados de ROS na presença de LPS de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*. NAC suprimiu ROS espontâneo e mediado por LPS e diminuiu a expressão de RNAm para as citocinas pró-inflamatórias. Além disso, NAC diminuiu significativamente a síntese e ativação de MMP-2 na presença e na ausência de LPS, sendo dependente da concentração. Em outro estudo, NAC possui capacidade de diminuir a perda óssea alveolar em ratos diabéticos com perda óssea alveolar experimental induzida por ligadura quando administrado de forma sistêmica (TOKER *et al.*, 2009).

Portanto, considerando-se o papel do NAC na modulação da resposta imune, nossa hipótese de trabalho é que a modulação dos níveis de GSH poderá promover uma resposta imune protetora na doença periodontal. Desta forma, procuramos testar no modelo experimental, se aplicação sistêmica de modulador de GSH NAC induz uma proteção ao desafio com bactérias periodontopatogênicas. Foram avaliados também os efeitos de NAC como modulador de GSH em sangue total de humanos infectados com uma ou mais bactérias periodontopatogênicas, bem como com LPS de *Porphyromonas gingivalis*. Com estes estudos buscamos verificar se o uso de moduladores de GSH pode ser futuramente empregado como método profilático ou como adjuvante no tratamento da doença periodontal. Acreditamos que o estudo das alterações na resposta imunológica periodontal frente ao desafio bacteriano do

biofilme dental constitui-se numa abordagem fundamental na busca por estratégias terapêuticas no combate à doença periodontal. É possível que um equilíbrio dos níveis de glutathione por meio da aplicação local de NAC possa auxiliar no retorno da homeostase tecidual e atuar na prevenção das doenças periodontais.

2- JUSTIFICATIVA:

Periodontite crônica e agressiva são doenças inflamatórias que afetam as populações humanas, sendo hoje a maior causa de perda dental nos países desenvolvidos. O estabelecimento da doença baseia-se em mecanismos dependentes da interação de patógenos periodontais e a resposta imunológica do hospedeiro, onde um desequilíbrio da resposta imune e uma falha ao retorno da homeostase promovem uma destruição dos tecidos periodontais (GJERMO *et al.*, 2002; VAN DYKE, 2008).

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo thiol presente em todas as células animais, possuindo papel fundamental na resposta imunológica (DRÖGE *et al.*, 1994). Estratégias terapêuticas visando o aumento dos níveis intracelulares de GSH na prevenção e tratamento de doenças têm sido propostas (KINSCHERF *et al.*, 1994; ROCHA-VIEIRA *et al.*, 2003; VENKETARAMAN *et al.*, 2003). NAC é uma variante acetilada de cisteína é capaz de estimular a síntese de GSH. Suplementação com NAC aumenta significativamente a proliferação de CD4⁺ (KINSCHERF *et al.*, 1994), bem como a frequência de células produzindo IFN-gama, induzindo a uma melhor resposta imune pela ativação mais eficiente de macrófagos (ROCHA-VIEIRA *et al.*, 2003). Além disto, NAC é capaz de inibir a translocação de NF- κ B, ativando a síntese de citocinas pró-inflamatórias (MORRIS *et al.*, 2013).

Tem-se especulado que repetidas infecções com *P. gingivalis* não aumentam os níveis de GSH em modelo de estudo, mantendo um estado Th2

dominante, atrasando desta forma a eliminação de *Porphyromonas gingivalis* (KATO *et al.*, 2008). Além disso, o aumento dos níveis de GSH demonstrou aumento na eliminação bacteriana, possivelmente pelo aumento dos níveis de IFN-gama que, por si, ativam macrófagos (KATO *et al.*,2008). Interessantemente, NAC, enquanto induz uma ativação celular em monócitos, induz também a expressão de moléculas como o CTLA-4 por linfócitos, auxiliando no controle de sua atividade e, possivelmente, evitando a propagação de uma resposta imune celular exacerbada (VIANNA, 2005). Um dado interessante foi que, no modelo experimental de perda óssea por ligadura, o tratamento com NAC sistêmico, diminuiu a perda óssea alveolar em ratos (TOKER *et al.*, 2009). Assim, estratégias que permitam a modulação da resposta imune no sentido de possibilitar a ativação de macrófagos e controle das bactérias, pode ser um mecanismo importante de controle da doença.

Poucos estudos avaliam o papel da GSH na resposta imune periodontal e o papel de NAC na indução de GSH em tecidos periodontais. Além disso, tem sido demonstrado que patógenos periodontais humanos diminuem os níveis de GSH, podendo conduzir a uma pior resposta imunológica. Considerando-se a importância da doença periodontal, o fato de que, mesmo tratada, pode apresentar inúmeros surtos reativos levando ao acúmulo de perda óssea e, eventualmente, perda dental, é fundamental buscar novos métodos profiláticos ou terapêuticos para a doença. Assim, este projeto marca o início dos estudos sobre o uso de

NAC local como um modulador da resposta imune, avaliando seu potencial terapêutico e profilático na doença periodontal.

3- OBJETIVOS:

3.1- Objetivo geral:

Avaliar os efeitos de N-acetil cisteína na modulação de características imunológicas e clínicas na doença periodontal.

3.2- Objetivos específicos:

Os objetivos específicos foram subdivididos em dois grupos: estudos envolvendo modelo experimental de doença periodontal e estudos envolvendo material proveniente de doadores saudáveis periodontalmente.

3.2.1 – Na infecção periodontal causada por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, avaliar:

a- os efeitos da utilização sistêmica de NAC na evolução clínica, traduzida por perda óssea;

b- os efeitos da utilização sistêmica de NAC na atividade de mieloperoxidase local;

c- os efeitos da utilização sistêmica de NAC na morte celular, modulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IFN-gama, TNF- α , IL-17 e IL-6) e citocina modulatória IL-10 em populações de linfócitos e células apresentadoras de antígeno de linfonodos cervicais;

d- os efeitos de NAC sistêmico nos níveis de GSH no sangue periférico;

3.2.2 - Em doadores saudáveis periodontalmente:

e - avaliar os efeitos diretos de NAC na proliferação, estabilidade ou morte nas colônias de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*;

f - avaliar os efeitos de NAC *in vitro* na ativação e atividade funcional de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ pela expressão de moléculas marcadoras de ativação (HLA-DR, CD28, CTLA-4) e de monócitos pela expressão de moléculas marcadoras de ativação (CD14, CD16, CD80, CD86), bem como a modulação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , il-6, IL-1 β , IL-17 e IFN-gama) e citocina modulatória IL-10 perante estímulo com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*.

g- Avaliar os efeitos de NAC *in vitro* na ativação e atividade funcional de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ pela expressão de moléculas marcadoras de ativação (HLA-DR, CD28, CTLA-4) e de monócitos pela expressão de moléculas marcadoras de ativação (CD14, CD16, CD80, CD86), bem como a modulação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , il-6, IL-1 β , IL-17 e IFN-gama) e citocina modulatória IL-10 perante estímulo com LPS de *Porohyromonas gingivalis*.

4- MATERIAL e MÉTODOS:

Os experimentos foram conduzidos em dois momentos diferentes. Para facilitar a compreensão, a metodologia será exposta em dois tópicos, a saber: 1- Modelo de estudo em camundongos (Quadro 3a); 2- Estudo *in vitro* envolvendo sangue de pacientes saudáveis tratados ou não com NAC e infectados ou não com bactérias periodontopatogênicas viáveis (Quadro 3b). 3-Estudo *in vitro* envolvendo sangue de pacientes saudáveis tratados ou não com NAC e infectados ou não com LPS de *Porphyromonas gingivalis* (Quadro 3c).

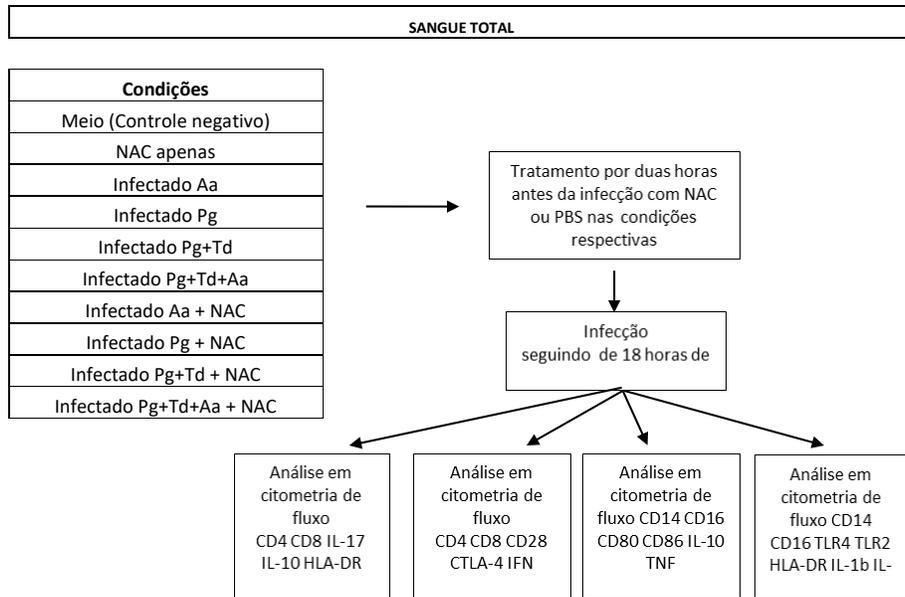
Quadro 3: Desenho experimental:

a**MODELO EXPERIMENTAL**

NAC SISTÊMICO				
Tipo de infecção	Não infectado		Infectado	
Grupos	Controle	NAC	Infectado apenas	Infectado e NAC
Tratamento	Água	NAC em água	Água	NAC em água
Para todos os grupos				
Amostras	Linfonodo	Sangue periférico	Maxila	
Tempo de sacrifício	48 horas	48 horas	45 dias	
Análises	Citometria de fluxo CD4, CD8, TNF, IFN, IL-17, IL-10, IL-6		GSH	MPO e perda óssea

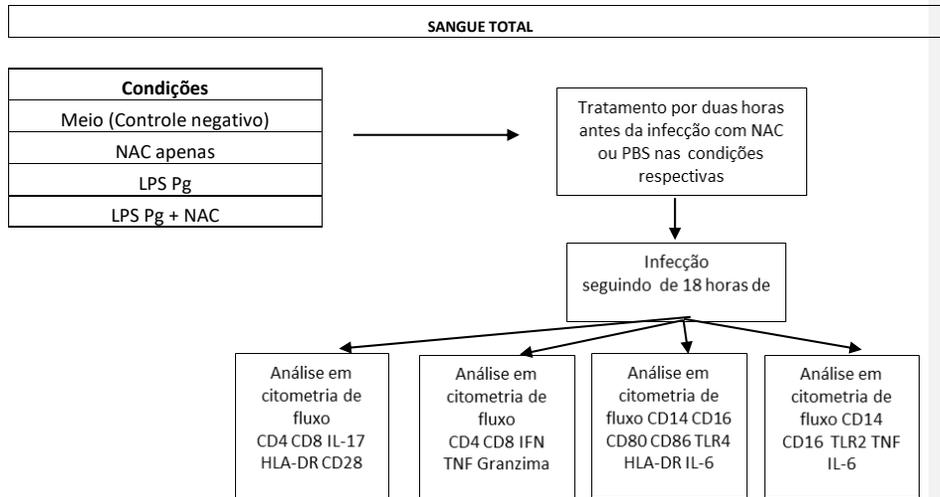
Quadro 3a: Desenho experimental de experimento em modelo de estudo para tratamento sistêmico com NAC ou tratamentos locais com NAC e escova ou NAC em carboximetilcelulose

b



Quadro 3b: Desenho experimental de *in vitro* de sangue total de pacientes saudáveis periodontalmente tratados ou não com NAC e infectados com bactérias periodontopatogênicas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e *Treponema denticola* (Td).

c



Quadro 3c: Desenho experimental de *in vitro* de sangue total de pacientes saudáveis periodontalmente tratados ou não com NAC e infectados com LPS de *Porphyromonas gingivalis* (Pg).

4.1- Avaliação do uso de NAC em modelo experimental de periodontite:

4.1.1 Animais:

Para avaliar se NAC pode alterar a evolução clínica da doença periodontal, um modelo de periodontite experimental foi utilizado em camundongos. Este trabalho foi aprovado pelo CETEA-UFMG através do protocolo 135/11. Todos os animais foram adquiridos do biotério central do Instituto de Ciências Biológicas-UFMG. Este modelo de doença periodontal em camundongos já vem sendo utilizado como forma de induzir uma perda óssea alveolar e avaliar a resposta

imune diante de bactérias periodontopatogênicas (MADEIRA *et al.*, 2012; QUEIROZ-JUNIOR *et al.*, 2012).

4.1.2 Indução da doença periodontal experimental:

Para o tratamento sistêmico com NAC 40 camundongos machos C57Bl/6, selvagens, entre 5 e 6 semanas de vida divididos entre quatro grupos com 10 animais divididos aleatoriamente em cada grupo: 1- grupo controle (tratados com água e não infectados); 2- grupo NAC (tratados com NAC em água e não infectados); grupo infectado (tratado com água e infectado com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) e grupo infectado e tratado (tratado com NAC em água e infectado com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). Os animais foram pesados e mantidos em quarentena após tratamento com Ivermectina 1g (200µg/kg de peso) em gaiolas de acordo com o grupo de estudo e alimentados com ração e água *ad libitum* até o início do experimento. A indução de doença periodontal experimental foi realizada baseada em estudos prévios (MADEIRA *et al.*, 2012; QUEIROZ-JUNIOR *et al.*, 2012). Os animais foram infectados com extrato de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (cepa Y4, proveniente da coleção do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, UFMG), na concentração de 1×10^9 CFU por 100µl de PBS. A cultura de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foi feita em placas com meio ágar (TSA- trypticase soy agar – agar tripton de soja) suplementado (extrato de levedura) e incubadas em jarros de anaerobiose. Após crescimento por dois dias das colônias em placa, estas foram transferidas para caldo (TSB - trypticase soy broth – caldo de tripton

soja) para crescimento exponencial por 24 horas. Após este período este caldo foi centrifugado e o “pellet” recolhido e ressuspendido em PBS 1X na concentração de 1×10^9 CFU/100 μ l de acordo com escala 4 de Mc Farland. O protocolo de indução da doença envolveu a dispensa por pipeta de 100 μ l desta concentração bacteriana acrescida de carboximetilcelulose a 2%. Uma inoculação complementar foi realizada inoculando 10 μ l desta concentração bacteriana diretamente na mucosa gengival no centro do palato, entre os primeiros e segundos molares, por meio de seringas Hamilton de 100 μ l. Esta indução foi repetida mais duas vezes em dias alternados, totalizando 3 infecções. Após cada infecção os animais permaneceram sem água (por uma hora) e sem ração (por duas horas).

4.1.3- Tratamento com NAC:

O tratamento com NAC sistêmico foi realizado em garrafas de água. A dose de 400mg/Kg de NAC para cada animal foi calculada de acordo com o consumo médio de água que camundongos nesta idade consomem (cerca de 6ml) ou seja 10mM de NAC por animal. Esta dose foi baseada em estudo prévio de nosso grupo (ROCHA-VIEIRA *et al.*, 2003) e de acordo com a literatura (GURBUZ *et al.*, 2009; WUYTS *et al.*, 2003; SPAGNUOLO *et al.*, 2006; NAVATH *et al.*, 2010; D'ALONZO *et al.*, 2012). O volume médio de água consumido por cada animal foi anotado diariamente. Para se evitar oxidação, NAC foi preparado diariamente e as garrafas trocadas diariamente. NAC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi diluído em água filtrada e o pH acertado. Garrafas com água apenas foram

destinadas para os animais que não receberam tratamento, sendo trocado e medido o consumo médio diariamente como o anterior.

Como o objetivo foi avaliar o efeito preventivo e modulatório de NAC, o tratamento sistêmico foi iniciado dois dias antes da primeira infecção e progrediu durante todo o curso do experimento.

4.1.4- Eutanásia:

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical sob analgesia e anestesia com quetamina/xilazina. Cinco animais de cada grupo do experimento com NAC sistêmico foram sacrificados 48 horas após a última indução de infecção. Demais animais do experimento de NAC sistêmico foram sacrificados 45 dias após a última indução de infecção.

4.1.5- Processamento do sangue periférico para análise de GSH

Antes da eutanásia de 48 horas, sangue periférico foi coletado dos animais do tratamento sistêmico com NAC. Este foi coletado em tubo de heparina e imediatamente transferido para eppendorf com ácido metafosfórico a 5% não proporção de 2:1 (ácido/sangue). Então as amostras foram agitadas em vortex e incubadas por 5 minutos protegida da luz. Após este período foram centrifugas em 10000g por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e estocado em -20°C até a análise para GSH por espectrofotometria. As amostras foram processadas para análise de GSH em kit de análise de GSH de acordo com instruções do fabricante (NWK-GSH01 Kit, Northwest Life Science Specialties, Vancouver, WA, EUA). Posteriormente, as amostras foram analisadas por colorimetria em

espectrofotômetro com absorvância em 412nm. Para quantificar GSH reduzida, nós subtraímos GSH total por GSSG.

4.1.6- Processamento de linfonodo cervical para citometria de fluxo de citocinas IL-10, IL-6, TNF- α , IL-17 e IFN- γ :

Para avaliar citocinas em linfonodos cervicais, cinco animais por grupo foram eutanasiados 48 horas após a última infecção com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Os linfonodos foram colocados em RPMI gelado, pesados e macerados para extração das células. Posteriormente as células foram centrifugadas em 500g por 8 minutos a 4°C e ressuspendidas em 1ml de RPMI gelado. As células foram contadas e semeadas em placa de 96 wells na concentração de 2×10^5 células por well. Então, as amostras foram processadas para marcação de moléculas de superfície e citocinas para citometria de fluxo como descrito anteriormente (DUTRA *et al.*, 2000). Anticorpos anti-mouse FITC conjugados anti-CD4 e anti-CD8 (FITC, Caltag Medsystems Ltd, Buckingham, UK) e PE conjugado anti- IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-17 e IL-6 (PE, eBioscience, San Diego, CA, EUA) foram utilizados. Inicialmente, o protocolo envolveu a marcação de moléculas de superfície. Para isto foi adicionado a cada poço o mix de anticorpo correspondente a cada marcação em 40 μ l de solução diluidora de anticorpos (50% de wash B [PBS 1X, 0,5% de BSA e 2mM de azida] + 50% de PBS 1X). Após esta adição, a placa foi incubada por 15 minutos a 4°C, protegido da luz. Então, foram adicionados 120 μ l de PBS gelado, a placa foi centrifugada a 4°C, por 10 minutos em 1200 RPM, desprezado o sobrenadante e a placa

cuidadosamente agitada em vortex. Foram adicionados, a cada poço, 100µl de PBS gelado e 100µl de formaldeído a 4% e a placa incubada por 20 minutos a temperatura ambiente. Após este período a placa foi centrifugada a 4°C, por 10 minutos em 1200 RPM, desprezado o sobrenadante e a placa agitada em vortex. Foi adicionado 150µl de wash B, novamente centrifugado, desprezado o sobrenadante e a placa cuidadosamente agitada em vortex; adicionaram-se 150µl de permeabilization buffer (Wash B + 0,5% de saponina), a placa foi levemente agitada e incubada por 10 minutos em temperatura ambiente, protegida da luz. Iniciou-se então a marcação de citocinas intracitoplasmáticas. Desta forma, foram adicionados, em cada poço, 40µl de permeabilization buffer acrescido dos anticorpos, além da adição novamente de IgG no poço de controle de isotipo. A placa foi incubada por 45 minutos em temperatura ambiente, protegida da luz. Após este período foi acrescido 150µl de permeabilization buffer, sendo então centrifugada, desprezado o sobrenadante e a placa cuidadosamente agitada em vortex. A placa ainda passou por mais um banho com permeabilization buffer e outro com wash B, para então ser acrescido 100µl de PBS junto com 100µl de formaldeído a 4% e o conteúdo transferido para tubos de leitura em FACS.

Para verificar a morte celular, poços de cada grupo foram marcados com 2µl de anexina em 40µl de binding buffer. A placa foi então incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz. Em seguida foram adicionados 2µl de iodeto de propídeo a cada poço e a suspensão de células

transferida para tubos de leitura de FACS contendo 150µl de binding buffer. Imediatamente após esta marcação os tubos foram lidos em FACScan.

Os tubos foram então encaminhados para a leitura em Facs Canto II (BD Biosciences, San Jose, California, USA), em dois canais de leitura (FL1 e FL2) correspondentes respectivamente aos fluorocromos FITC e PE. De acordo com o feixe de laser que atravessa o tubo de passagem da solução contendo as células em suspensão é possível separar as diferentes populações de células marcadas com os anticorpos. Foram coletados 50.000 eventos dentro do gate de linfócitos por amostra. Após a leitura em os dados foram analisados em software Flow Jo 7.6.4 (TreeStar Inc., Ashland, OR, EUA).

4.1.7- Processamento e análise de maxila para MPO e perda óssea alveolar:

Cinco animais de cada grupo foram sacrificados 45 dias após a última infecção. A maxila foi dissecada e removida inteiramente. Posteriormente foi selecionada apenas a região médio distal desta, envolvendo os molares. A seguir, as maxilas foram divididas em duas secções (hemimaxilas), direita e esquerda, ao longo da sutura média palatina. Uma das hemimaxilas foi dissecada, removendo-se o máximo de tecido mole e processada para análise de perda óssea clínica. Para isto, estas hemimaxilas foram acondicionadas em placas de 24 poços contendo H₂O₂ a 10% por 24 horas para facilitar a remoção de tecido mole. Logo após, estas foram limpas e lavadas em água destilada e novamente incubadas em H₂O₂, para então serem limpas novamente e secas a temperatura ambiente. O

tecido mole gengival desta maxila foi processado em OCT para futuras análises em microscopia de fluorescência. As maxilas secas foram coradas com azul de metileno a 3%, secas e fotografadas com o auxílio de lupa de dissecação, com aumento de 20X. A perda óssea foi medida calculando-se a área correspondente à distância da linha amelo-cementária até a crista óssea, na região palatina dos primeiros molares, utilizando o software Image J (NIH, National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA) pela média de três medidas. Estas amostras foram analisadas de forma cega, sem o conhecimento prévio de qual amostra pertencia a determinado grupo.

A outra hemimaxila foi processada para análise de atividade de MPO. Para isto, cada maxila foi estocada em eppendorf em freezer -20°C até o momento da análise. As maxilas foram pesadas previamente para determinação das soluções. Posteriormente foram homogeneizadas (Ultramax – homogeneizador de tecidos) em Buffer 1 (NaCl 0,1M, Na₃PO₄ 0,02M, Na₂ EDTA 0,015M – pH 4,7) gelado (1,9ml/10mg). Posteriormente, o tecido macerado foi centrifugado a 4°C, por 10 minutos a 10000 RPM. Novamente foi adicionado buffer 1 e homogeneizado. Então, foi centrifugado a 4°C, por 10 minutos a 10000 RPM e desprezado o sobrenadante. Posteriormente foi adicionado NaCl 0,2% gelado ao precipitado e aguardado 30 segundos e logo em seguida adicionado NaCl 1,6% com glicose 5% gelada. Novamente foi homogeneizado e centrifugado. O sobrenadante foi desprezado e então foi adicionado o Buffer 2 (Na₃PO₄ 0,05M, HLTAB 0,5% - pH 5,4) à temperatura ambiente. Neste momento, as amostras foram

homogeneizadas, congeladas (nitrogênio líquido) e descongeladas por três vezes. Novamente foi centrifugado e o sobrenadante foi coletado para o ensaio enzimático. As amostras foram dispensadas em placa de 96 poços (25µl) em duplicata. Foram então adicionados 25µl de substrato TMB e a mostra foi incubada a 37°C por 5 minutos. Então, foi adicionado 100µl de H₂O₂ (0,002%) e incubado por 5 minutos a 37°C. Finalmente foi adicionado 100µl de H₂SO₄ para paralisar a reação e então lido em espectrofotômetro em OD 450nm.

4.2- Estudo *in vitro* envolvendo sangue de pacientes saudáveis tratados ou não com NAC e infectados ou não com bactérias periodontopatogênicas viáveis

4.2.1- Pacientes:

Foram selecionados quatro indivíduos saudáveis periodontalmente para a análise dos efeitos *in vitro* de NAC em sangue periférico infectados com as bactérias periodontais *Aa*, *P. gingivalis*, *T. denticola* separadas ou em conjunto. O diagnóstico das condições de saúde periodontal foi feito considerando a história médica e dental de cada indivíduo, achados radiográficos e observação dos sinais e parâmetros clínicos como profundidade de sondagem (PS), perda de inserção clínica (PIC), mobilidade dental, sangramento à sondagem e presença de biofilme e cálculo dental, de acordo com Armitage (1999). Medidas de PS e PIC foram realizadas em seis pontos com sonda periodontal ao redor dos dentes. Os indivíduos não eram fumantes ou possuíam doenças sistêmicas não controladas,

não eram grávidas e mulheres amamentando, não estavam em uso de antibióticos, anti-inflamatórios, anticoagulantes nos últimos três meses, e não necessitam de cobertura antibiótica profilática ou são portadores de doenças autoimunes.

4.2.2- Cultura de bactérias periodontopatogênicas:

Três bactérias de grande importância na indução da doença periodontal (*Aa*, *P. gingivalis*, *T. denticola*) foram obtidas da coleção de microorganismos do departamento de microbiologia do SRI International (CA-EUA) pela pesquisadora e colaboradora Kristien Mortelmans. Estas bactérias foram crescidas em placas de BHI (Brain heart infusion - Sigma-Aldrich) em ambiente anaeróbico por dois dias. Após este período as colônias foram transferidas para tubos de ensaio contendo caldo de BHI para crescimento exponencial por um dia na concentração de 1×10^9 bactérias por ml de acordo com a escala 4 de McFarland. Para se testar os efeitos de NAC na proliferação, estabilidade ou morte de colônias de bactérias periodontopatogênicas foi realizado experimento, em duplicata, de MIC (mínima concentração inibitória) utilizando-se tanto NAC quanto metronidazol (um conhecido antimicrobiano inibidor destas bactérias) como controle. Desta forma, em anaerobiose, foram adicionados 97,5µl da suspensão de bactérias (1×10^9) em cada poço e diversas diluições de NAC e metronidazol, sendo para NAC: 40mM, 20mM, 10mM, 5mM, 2,5mM, 1,25mM, 0,75mM, 0,32mM e para metronidazol: 3,2µg até 0,025µg em diluições de 1:2. A placa foi mantida em

cultura de anaerobiose por dois dias e posteriormente as amostras foram analisadas em espectrofotômetro em OD de 600nm.

4.2.3- Obtenção de células de sangue total:

Para a análise de sangue total (ST) foram coletados de cada indivíduo 24ml de sangue venoso em tubos heparinizados. Essas amostras foram aliquotadas em tubos tipo "Falcon" de 15 ml de acordo com cada condição. Então, NAC na concentração de 10mM em volume final, foi adicionado nos tubos tratados enquanto nos tubos controles e infectados apenas foi adicionado PBS.

4.2.4- Infecção de sangue total com bactérias periodontopatogênicas:

Para infecção de sangue total foram utilizadas bactérias periodontopatogênicas viáveis *Aa*, *P gingivalis* e *T denticola*, individualmente ou em conjunto. O protocolo de infecção ficou definido com a proporção de 1:50 (célula/bactérias) testado por nós e similar a prévio estudo (BODET e GRENIER, 2010). Sendo assim, em 2×10^6 cels/ ml de sangue total foi utilizado 1×10^9 bact./ml. Após dois dias de crescimento em placa BHI e constatando que não havia contaminação, foram transferidas colônias para tubo contendo caldo de BHI na concentração de 1×10^9 bact/ml de acordo com a escala de MacFarland. Estes foram centrifugados a 22°C, 7500 RPM por 5 minutos. Novamente em câmara de anaerobiose, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas por duas vezes em PBS 1 X estéril para remoção de proteínas relacionadas a BHI. Logo em seguida, as bactérias foram ressuspensas em 1ml, checada turbidez pela escala de MacFarland e transferidas imediatamente, sob proteção da luz,

para a infecção de células em sangue total. Duas horas da infecção, as condições que receberiam NAC foram tratadas com esta substância com uma concentração final de 10mM. Condições não tratadas com NAC receberam PBS no mesmo volume. Após este período foi realizada a infecção dispensando bactérias viáveis no sangue total. Para as condições que receberam grupos de bactérias, a mesma proporção de cada bactéria foi adicionada.

Logo em seguida as amostras foram colocadas em cultura em estufa a 37°C, com 5% CO₂, por 18 horas. Após o período de 14 horas foi adicionado a cada tubo Brefeldina A na proporção de 1:1000 para paralisar a formação de vesículas de secreção intracitoplasmáticas, mantendo as citocinas no interior celular. Incubou-se por mais 4 horas perfazendo um total de 18 horas de cultura. Findo o período de cultura, hemácias de cada tubo foram lisadas por solução de lise comercial (Biolegend, San Diego, CA, EUA). Para isto, foi adicionada, em cada tubo, solução de lise na proporção de 1:20 sangue total/solução de lise. As amostras foram então gentilmente misturadas e incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz. Seguido este período de incubação as amostras foram centrifugadas por 4°C, 1300 RPM por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o "pellet" destacado e ressuspensionado em 15ml de PBS. Novamente as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. O "pellet" destacado foi ressuspensionado em PBS em um volume 10 vezes menor que o volume inicial de sangue total.

Em seguida procedeu-se o protocolo de marcação de moléculas de superfície e de citocinas de acordo com Dutra *et al.* (2000), conforme descrito anteriormente. Anticorpos anti-human conjugados (Biolegend, San Diego, CA, EUA) com diferentes fluorocromos foram utilizados (Quadro 4).

Quadro 4: Anticorpos com os respectivos fluorocromos:

Anticorpo anti	Fluorocromo
CD4	APC Cy 7
CD8	PerCP 5.5
CD28	APC
CTLA 4	PE
HLA-DR	V500
CD14	PerCP 5.5
CD16	APC Cy 7
CD80	PE CY 7
CD86	Pacific Blue
TLR4	PE
TRL2	FITC
IL-17	Pacific Blue
IL-10	PE
TNF alfa	APC
IFN	Pacific Blue
L-6	PE
IL-1 beta	Pacific Blue
Anexina	FiITC
PI	PE

Quadro 4: Relação de anticorpos e seus respectivos fluorocromos

Após o protocolo de marcação as amostras foram imediatamente lidas em aparelho FACS LSRII e os dados coletados e analisados em programa FlowJo.

4.3- Estudo *in vitro* envolvendo sangue de pacientes saudáveis tratados ou não com NAC e infectados com LPS de *Porphyromonas gingivalis*:

4.3.1- Pacientes:

Foram selecionados seis indivíduos saudáveis periodontalmente para a análise dos efeitos *in vitro* de NAC em sangue periférico infectados com LPS de *Porphyromonas gingivalis*. A seleção dos pacientes e a obtenção do sangue periférico foram similares ao descrito anteriormente.

5- ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os dados analisados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados dos experimentos em modelo de estudo de animais foram analisados pelo perfil paramétrico utilizando-se ANOVA 1 way com pós teste de Tukey. Os dados de ensaio *in vitro* de sangue total de humanos foram confirmados a normalidade por meio de teste de Shapiro-Wilk e então analisados por teste *T* pareado ou ANOVA 1 way. Para a análise de normalidade foi utilizado o programa estatístico R. Para a análise da média e desvio padrão foi utilizado o programa Excel 2010 e para a análise de ANOVA e teste *T* foi utilizado o programa Prisma 5. O nível de significância estabelecido foi de $\alpha = 0,05$ (bi-caudal) e o valor de $p < 0,05$.

6- RESULTADOS:

Este estudo se propôs a demonstrar que a modulação dos níveis de GSH por NAC e seus efeitos em características imunológicas de leucócitos em modelo de doença periodontal e em ensaios *in vitro* de sangue de humanos infectados com bactérias periodontopatogênicas possa vir a ser uma alternativa adjuvante na prevenção e controle das doenças periodontais. O estudo das alterações na resposta imunológica frente ao desafio com bactérias do biofilme dental associadas à doença periodontal constitui-se numa abordagem fundamental na busca por estratégias terapêuticas no combate a esta doença. Optamos demonstrar aqui apenas os resultados que foram estatisticamente significantes para todos os ensaios, embora aqueles que não tenham sido estatisticamente significativos estejam também citados no texto.

6.1- Em modelo experimental:

- Efeito do tratamento com NAC na perda óssea de camundongos submetidos ou não ao tratamento com NAC e infectados com *Aa* (Objetivo específico a):

A análise da perda óssea clínica é um indicativo da indução da doença periodontal por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* neste modelo de estudo (GARLET *et al.* 2005). O consumo médio diário de água e o peso médio inicial e final foram similares para todos os grupos. Os resultados demonstraram que animais infectados com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tiveram uma evidente perda óssea alveolar quando comparado com o grupo controle. Animais

infectados e tratados com NAC sistemicamente demonstraram significativa redução na perda óssea alveolar quando comparado com o grupo infectado apenas (Figura 4A e B).

Figura 4: Perda óssea alveolar em camundongos:

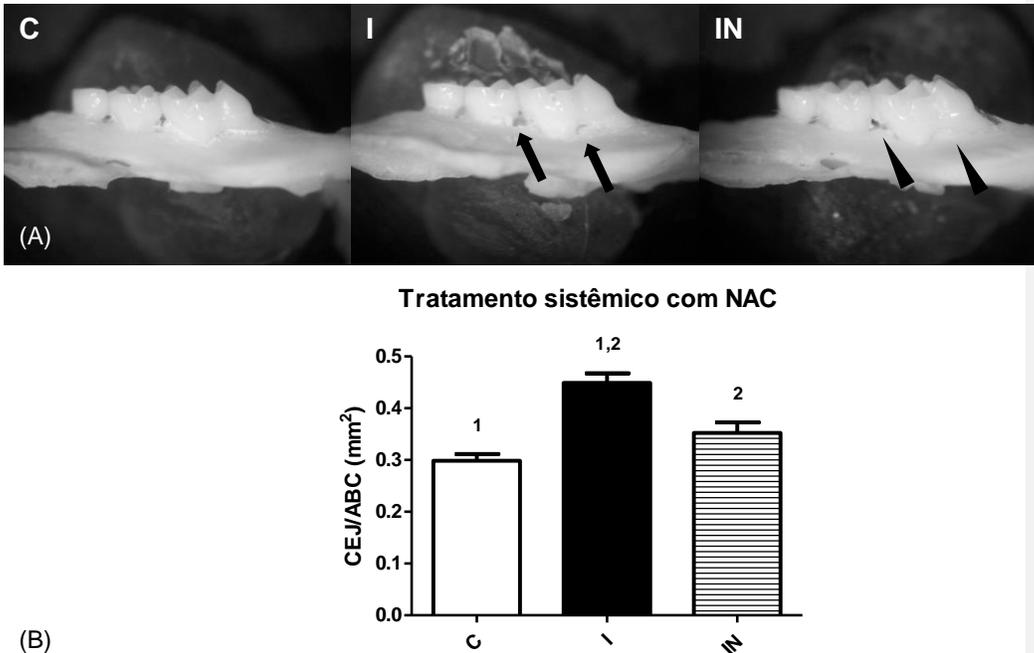


Figura 4 – Medida de perda óssea alveolar em maxila de camundongos de modelo experimental de doença periodontal. (A) Fotografias representativas das amostras de maxilas de grupo de controle (C), tratado com NAC (N), infectado com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (I) e infectado e tratado com NAC (IN). Infecção demonstra exacerbação da perda óssea exacerbação da perda de osso alveolar (setas), no entanto, NAC protege contra a perda de osso alveolar (seta de cabeça).

(B) A análise morfométrica da perda óssea alveolar em maxila. O grupo infectado demonstrou uma perda óssea alveolar significativa quando comparado com o grupo controle (C) e NAC (N). Tratamento NAC sistêmico protegeu contra a perda óssea alveolar induzida por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (IN) quando comparado com o grupo infectado (I). CEJ / ABC (mm²) – área entre a junção amelo-cementária e a crista alveolar em mm². ^{1,2,3} indicam uma diferença significativa entre os grupos. P < 0,05.

- Efeitos de NAC sistêmico na atividade de MPO (Objetivo específico b)

Como a atividade de MPO é um importante indicativo de doença periodontal (QUEIROZ-JUNIOR *et al.*, 2009) nós analisamos a atividade desta peroxidase neste modelo de estudo. Como esperado, os níveis de atividade de MPO em camundongos infectados (I) foram significativamente mais elevados comparado com o grupo controle (C) (Figura 5). Embora atividade de MPO tenha sido elevada para o grupo infectado e tratado com NAC (IN) comparado com grupo controle (C), tratamento com NAC foi capaz de diminuir significativamente a atividade de MPO comparado com o grupo infectado (I).

-

Figura 5: Atividade de mieloperoxidase em maxila de camundongos:

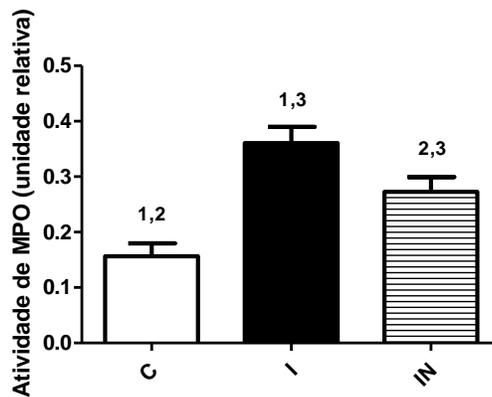


Figura 5- Análise colorométrica para a atividade de MPO. Grupo infectado (I) demonstrou um aumento significativo na atividade de MPO comparado com o controle (C). Apesar do grupo tratado com NAC (IN) estar elevado comparado com controle (C), NAC foi capaz de diminuir significativamente a atividade de MPO compara com o grupo infectado (I). ^{1,2,3} indicam uma diferença significativa entre os grupos . $P < 0,05$.

- Efeitos de NAC sistêmico na modulação de citocinas em linfonodo cervical de doença periodontal experimental (Objetivo específico c):

Para avaliar a capacidade de NAC de modular a resposta imune através da alteração em citocinas nós investigamos a marcação das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-17, IL-6 e IFN- γ e citocina modulatória IL-10 em populações de linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺ e células apresentadoras de antígeno de linfonodos cervicais de camundongos neste modelo experimental de doença periodontal. A frequência de células expressando TNF- α em linfócitos totais e em linfócitos T

CD4⁺ foi significativamente mais elevada em animais infectados que animais não infectados. Porém, tratamento com NAC reduziu significativamente a expressão de TNF- α em linfócitos totais, linfócitos T CD4⁺ e em células apresentadoras de antígeno quando comparado com o grupo infectado apenas (Figura 6).

Figura 6: Análise para citocina TNF-alfa em camundongos:

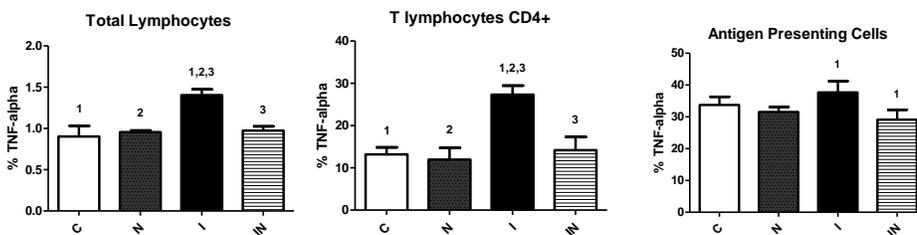


Figura 6: Análise por citometria de fluxo de citocinas de linfonodo cervical de camundongo. TNF alfa foi significativamente elevada no grupo infectado (I) em linfócitos totais e em linfócitos T CD4⁺ comparado com o grupo controle (C) e NAC (N). De forma interessante, tratamento com NAC (IN) conseguiu modular negativamente e restaurar os níveis desta citocina comparado com o grupo infectado (I) em linfócitos totais, linfócitos T CD4⁺ e em células apresentadoras de antígeno. ^{1,2,3} indicam uma diferença significativa entre os grupos. $P < 0,05$.

Não houve diferença estatística na frequência de expressão de IFN- γ em linfócitos totais e em linfócitos T CD4⁺ entre os diferentes grupos. Contudo, a expressão de IFN- γ foi significativamente mais elevada em linfócitos T CD8⁺ de animais tratados com NAC quando comparado com animais infectados apenas (Figura 7).

Figura 7: Análise para citocina IFN-gama em camundongos:

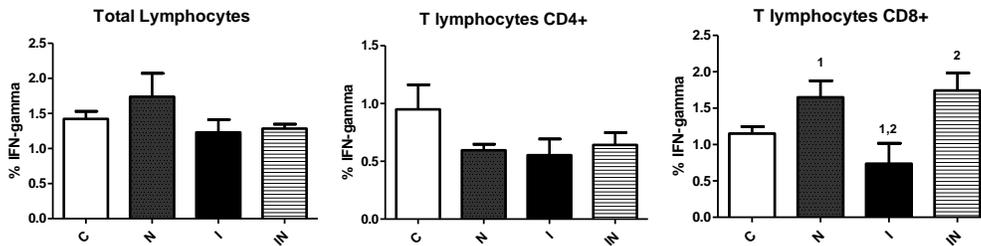


Figura 7: Análise por citometria de fluxo de citocinas de linfonodo cervical de camundongo. Não foi demonstrada diferença estatística IFN gama para todos os grupos em linfócitos totais e em linfócitos T CD4+. Entretanto, tratamento com NAC (N e IN) foi capaz de elevar significativamente os níveis desta citocina em linfócitos T CD8+ comparado com o grupo infectado (I). ^{1,2} indicam uma diferença significativa entre os grupos . P < 0,05.

A expressão da citocina pró-inflamatória IL-17 foi significativamente mais elevada em linfócitos totais de animais infectados quando comparados com animais não infectados. Da mesma forma, houve um aumento significativo de células CD4⁺ IL-17⁺ no grupo infectado quando comparado com os grupos não infectados. De forma interessante, NAC foi capaz de modular negativamente a expressão de IL-17 em linfócitos totais e linfócitos T CD4⁺ IL-17⁺ quando comparado com animais infectados apenas ($p < 0,05$) (Figura 8).

Figura 8: Análise para citocina IL-17 em camundongos:

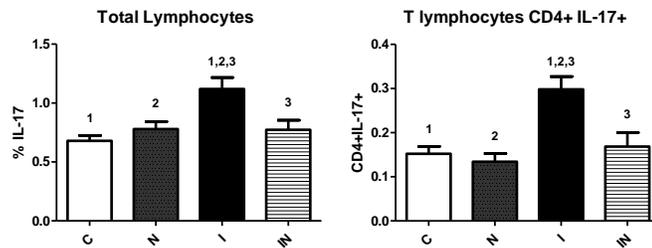


Figura 8: Análise por citometria de fluxo de citocinas de linfonodo cervical de camundongo. IL-17 foi significativamente elevada no grupo infectado (I) em linfócitos totais e em linfócitos T CD4+ comparado com o grupo controle (C) e NAC (N). De forma interessante, tratamento com NAC (IN) conseguiu modular negativamente e restaurar os níveis desta citocina comparado com o grupo infectado (I) em linfócitos totais, linfócitos T CD4+. ^{1,2,3} indicam uma diferença significativa entre os grupos. $P < 0,05$.

NAC restabeleceu a frequência da citocina modulatória IL-10. Animais do grupo infectado diminuíram significativamente a frequência e a intensidade média de fluorescência para IL-10 comparado com o grupo controle em células apresentadoras de antígeno (Figura 9A e B). Contudo, este padrão foi restaurado a níveis normais no grupo infectado e tratado com NAC (Figura 9A e B). Além disto, NAC elevou e restaurou de forma significativa os níveis de citocina modulatória IL-10 em linfócitos totais e em linfócitos T CD4+ quando comparado com animais infectados apenas (Figura 9A e B).

Figura 2: Análise para citocina IL-10 em camundongos:

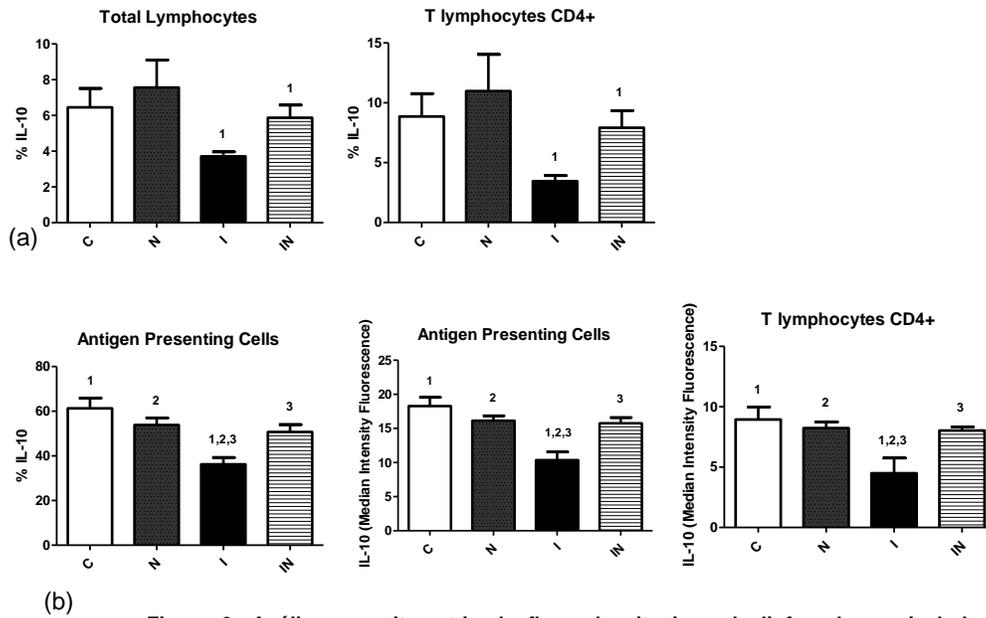


Figura 9: Análise por citometria de fluxo de citocinas de linfonodo cervical de camundongo. A Animais infectados (I) demonstraram uma diminuição significativa na porcentagem de IL-10 em células apresentadoras de antígeno e na intensidade média de fluorescência em células apresentadoras de antígeno e em linfócitos T CD4+ comparado com o controle (C) (figuras 9a e b). Tratamento com NAC foi capaz de restaurar os níveis desta citocina em linfócitos totais, linfócitos T CD4+ e em células apresentadoras de antígeno comparado com o grupo infectado (I) (figuras 9a e b). ^{1,2,3} indicam uma diferença significativa entre os grupos . P < 0,05.

Quando comparou-se a razão entre a citocina modulatória IL-10 e a citocina inflamatória TNF- α em células apresentadoras de antígeno, linfócitos totais e em linfócitos T CD4+, NAC elevou significativamente a razão IL-10/TNF- α no grupo

tratado com NAC e infectado quando comparado com o grupo infectado apenas (Tabela 1).

Tabela 1: Razão entre IL-10/TNF-alfa:

Total Lymphocytes				
Groups	IL-10 Mean \pm SD	TNF- α Mean \pm SD	Ratio IL-10/TNF- α Mean \pm SD	<i>p</i>
I	3,7 \pm 0,5	1,4 \pm 0,2	2,69 \pm 0,38	0,017
IN	5,8 \pm 1,8	1.0 \pm 0,1	5,97 \pm 1,72	

T Lymphocytes CD4+ cells				
Groups	IL-10 Mean \pm SD	TNF- α Mean \pm SD	Ratio IL-10/TNF- α Mean \pm SD	<i>p</i>
I	3,5 \pm 0,9	26,7 \pm 5,3	0,13 \pm 0,01	0,032
IN	8,1 \pm 3,7	14,2 \pm 6,3	0,63 \pm 0,26	

Antigen Presenting Cells				
Groups	IL-10 Mean \pm SD	TNF- α Mean \pm SD	Ratio IL-10/TNF- α Mean \pm SD	<i>p</i>
I	36,3 \pm 6,1	39,5 \pm 7,8	0,96 \pm 0,33	0,007
IN	50,7 \pm 7,4	29,1 \pm 7,0	1,84 \pm 0,46	

Tabela1- Comparação do padrão entre citocina IL-10 e citocina TNF alfa. Comparando o padrão de citocina modulatória IL-10 e citocina pró-inflamatória TNF-alfa observa-se que tratamento com NAC (IN) elevou significativamente o padrão IL-10/TNF-alfa em linfócitos totais, linfócitos T CD4+, e células apresentadoras de antígeno comparado com o grupo infectado (I).

- Efeitos de NAC sistêmico em GSH total, GSH reduzida e GSSG em sangue periférico (Objetivo específico d):

Alterações na quantidade de GSH total, GSH reduzida, GSSG bem como no padrão GSH/GSSG são indicativos de stress oxidativo (MEISTER, 1994). Para avaliar se infecção com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e tratamento

com NAC alteram a quantidade de GSH, investigou-se a quantidade deste tripeptídeo em sangue periférico. Inicialmente foi definida uma curva de GSH para quantificação de GSH total e GSSG. Não houve diferença significativa de GSH reduzida entre os grupos (dados não mostrados); contudo, GSH total foi significativamente mais elevado para o grupo infectado quando comparado com o grupo infectado e tratado com NAC (Figura 10). Interessantemente, GSSG também foi significativamente mais elevado para os animais infectados quando comparado com animais infectados e tratados com NAC (Figura 10), demonstrando uma desregulação no estado redox de animais infectados. Não houve diferença estatística no padrão de GSH/GSSG entre os grupos.

Figura 3: Análise GSH/GSSG em camundongos:

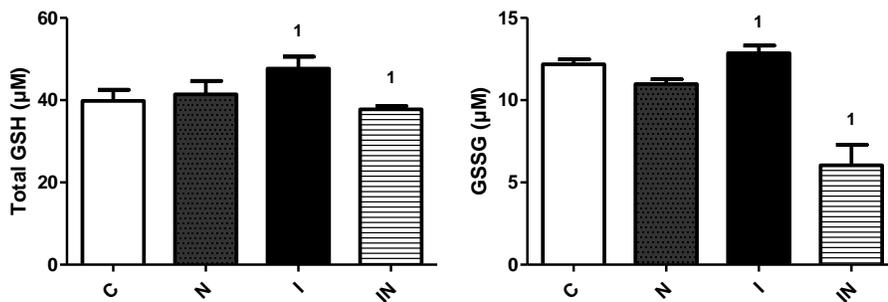


Figura 10: Análise por espectrofotometria de GSH total e GSSG em sangue periférico de camundongo. Tratamento com NAC (IN) foi capaz de reduzir significativamente a quantidade relativa de GSH total e GSSG comparado com o grupo (I). ^{1,2} indicam uma diferença significativa entre os grupos . $P < 0,05$.

6.2 Estudo *in vitro* do perfil de células de sangue total de doadores saudáveis periodontalmente infectados com bactérias periodontopatogênicas viáveis:

Tendo em vista que NAC tem a capacidade de modular citocinas em linfonodos de camundongos, nos partimos para investigar a ação de N-acetil cisteína em células de sangue periférico de humanos saudáveis periodontalmente e infectado com bactérias periodontopatogênicas.

- Efeitos diretos de NAC na proliferação, estabilidade ou morte nas colônias de *Aa*, *P. gingivalis*, *T. denticola* (objetivo específico e):

Para verificar se NAC foi capaz de interferir no crescimento ou morte de bactérias periodontopatogênicas, nós realizamos um ensaio de MIC com diversas concentrações de NAC em três bactérias periodontopatogênicas, *P. gingivalis* (*Pg*), *T. denticola* (*Td*) e *Aa*. Os ensaios foram feitos em duplicata e demonstraram que NAC não exerce nenhuma influência no crescimento ou morte celular destas bactérias estudadas (Figura 11, 12 e 13).

Figura 11: Efeito de NAC em *Porphyromonas gingivalis*:

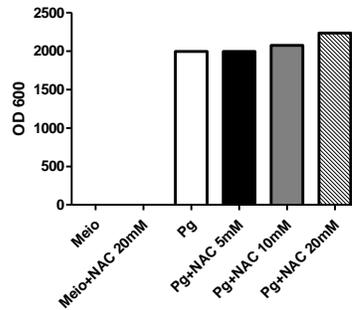


Figura 11: Análise da influencia de NAC em bactérias periodontopatogênicas. A avaliação interferência de NAC na proliferação, estabilização ou morte celular em cultura de *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) de 48 horas não demonstrou alteração na cultura de *Pg* (barra branca) quando comparado com culturas de *Pg* tratadas com diversas concentrações de NAC (*Pg*+NAC 5mM, *Pg*+NAC 10mM e *Pg*+NAC 20mM, barras preta, cinza e listrada, respectivamente). Observa-se que meio sem cultura bacteriana e meio sem cultura bacteriana e tratado com NAC (controle negativo) não demonstraram proliferação. Dados obtidos em duplicata em espectrofotometria (OD 600).

Figura 4: Efeito de NAC em *Treponema denticola*

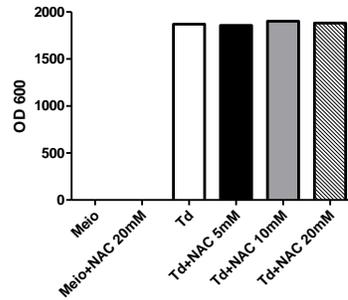


Figura 12: Análise da influencia de NAC em bactérias periodontopatogênicas. A avaliação interferência de NAC na proliferação, estabilização ou morte celular em cultura de *T denticola* não demonstrou alteração na cultura de *Td* (barra branca) quando comparado com culturas de *Td* tratadas com diversas concentrações de NAC (*Td*+NAC 5mM, *Td*+NAC 10mM e *Td*+NAC 20mM, barras preta, cinza e listrada, respectivamente). Observa-se que meio sem cultura bacteriana e meio sem cultura bacteriana e tratado com NAC (controle negativo) não demonstraram proliferação. Dados obtidos em duplicata em de espectrofotometria (OD 600).

Figura 13: Efeito de NAC em *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

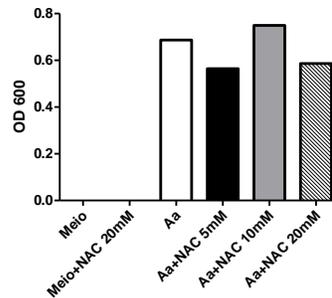


Figura 13: Análise da influencia de NAC em bactérias periodontopatogênicas. A avaliação interferência de NAC na proliferação, estabilização ou morte celular em cultura de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) de 48 horas não demonstrou alteração na cultura de Aa (barra branca) quando comparado com culturas de aa tratadas com diversas concentrações de NAC (Aa+NAC 5mM, Aa+NAC 10mM e Aa+NAC 20mM, barras preta, cinza e listrada, respectivamente). Observa-se que meio sem cultura bacteriana e meio sem cultura bacteriana e tratado com NAC (controle negativo) não demonstraram proliferação. Dados obtidos em duplicata em espectrofotometria (OD 600).

A partir do momento que observamos que NAC não influenciava o crescimento de bactérias periodontopatogênicas decidimos conduzir ensaios de infectividade em leucócitos de sangue total de doadores saudáveis periodontalmente. Para facilitar o entendimento da modulação da resposta imune por NAC nós compartimentamos os dados da seguinte forma: análise da influência em subpopulações de linfócitos e de monócitos; análise da frequência de marcação de citocinas nas diversas subpopulações de linfócitos e em monócitos.

- Efeitos de NAC *in vitro* na ativação e atividade funcional de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ pela expressão de moléculas marcadoras de ativação (HLA-

DR, CD28, CTLA-4) e citocinas (IFN-gama, IL-17 e IL-10) perante estímulo com *Aa*, *P. gingivalis*, *T. denticola* (objetivo específico f):

Ao avaliar a ativação de linfócitos T por molécula co-estimulatória CD28 observamos que NAC é capaz de modular negativamente moléculas como CD28 em diversas populações de linfócitos (Figura 14 a 20).

Observou-se que NAC diminuiu a expressão de CD28 em células CD4+ em culturas estimuladas individualmente com *Pg* e *Td* (Figura 17 e 18), mas não em culturas com *Aa* (não mostrado). Observou-se ainda que NAC diminuiu a expressão de CD28 em células CD4+ em culturas estimuladas com as 3 bactérias conjuntamente (Figura 19). Interessantemente, a modulação da expressão de CD28 em células CD8+ deu-se apenas nas culturas na presença de *Pg* (Figura 20) e em nenhuma outra condição.

Figura 14: Análise de citometria de IMF para CD28 em CD4⁺ para *P. gingivalis*:

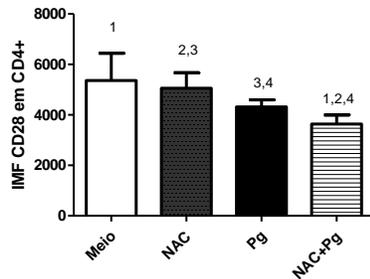


Figura 14: Análise por citometria de fluxo de moléculas de superfície em sangue total de indivíduos saudáveis periodontalmente. A intensidade média de fluorescência (IMF) de CD28 em células T CD4⁺ em culturas tratadas ou não com NAC e infectadas ou não com *Porphyromonas gingivalis* (Pg), conforme indicado. ^{1,2,3} indica uma diferença significativa entre os grupos. $P < 0,05$.

Figura 5: Análise citometria de IMF de CD28 em CD4⁺ em *T. denticola*

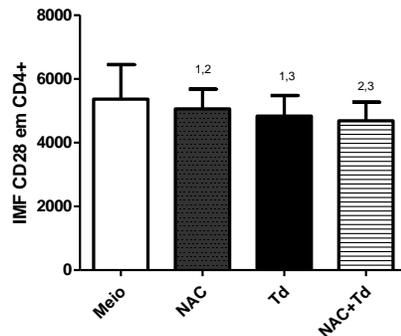


Figura 15: Análise por citometria de fluxo de moléculas de superfície em sangue total de indivíduos saudáveis periodontalmente. A intensidade média de fluorescência (IMF) de CD28 em células T CD4⁺ em culturas tratadas ou não com NAC e infectadas ou não com *Treponema denticola* (Td), conforme indicado. ^{1,2,3} indica uma diferença significativa entre os grupos. $P < 0,05$.

Figura 16: Análise citometria IFM CD28 em CD4+ em 3 bactérias:

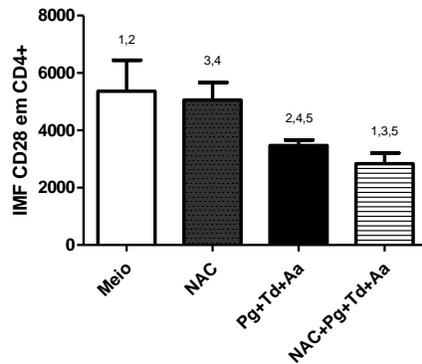


Figura 16: Análise por citometria de fluxo de moléculas de superfície em sangue total de indivíduos saudáveis periodontalmente. A da intensidade média de fluorescência (IMF) de CD28 em células T CD4+ em culturas tratadas ou não com NAC e infectadas ou não com *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Treponema denticola* (Td) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), conforme indicado. ^{1,2,3, 4,5,i} indica uma diferença significativa entre os grupos . P < 0,05.

Figura 176: Análise citometria IMF CD28 em CD8+ em *P gingivalis*

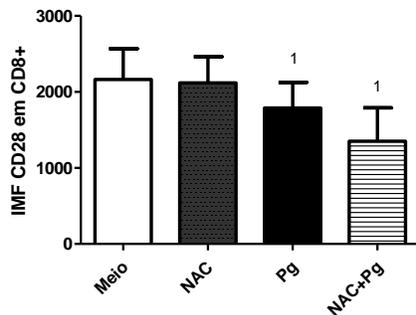


Figura 17: Análise por citometria de fluxo de moléculas de superfície em sangue total de indivíduos saudáveis periodontalmente. Amostras infectadas *P gingivalis* e tratadas com NAC diminui significativamente a intensidade média de fluorescência de CD 28 em linfócitos

T CD8⁺ comparado com grupo infectado apenas. ¹indica uma diferença significativa entre os grupos . P < 0,05.

- Efeitos de NAC *in vitro* na ativação e atividade funcional de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ pela expressão de moléculas marcadoras de ativação (HLA-DR, CD28, CTLA-4) e citocinas (IFN-gama, IL-17 e IL-10) perante estímulo com LPS de *P gingivalis* (objetivo específico g):

Seguindo o estudo de sangue periférico, nós estimulamos células de sangue total com LPS de *P gingivalis*, um antígeno reconhecidamente indutor de efeitos deletérios nos tecidos periodontais.

Tal qual a resposta com bactérias viáveis, NAC foi capaz de modular negativamente a frequência de marcação e a intensidade média de fluorescência de CD28 em linfócitos T CD8⁺ e em linfócitos totais (Figuras 18 e 19).

Figura 18: Análise citometria de CD8+ CD28+ em LPS *P gingivalis*:

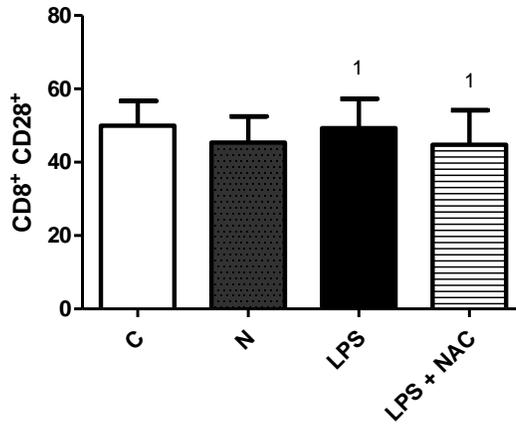


Figura 18: Análise por citometria de fluxo de moléculas de superfície em sangue total de indivíduos saudáveis periodontalmente. Amostras estimuladas com LPS de *P gingivalis* e tratadas com NAC diminuiram significativamente a frequência de marcação de CD28 em linfócitos T CD8+ comparado com o grupo estimulado apenas. ¹indica uma diferença significativa entre os grupos. $P < 0,05$.

Figura 19: Análise citometria de IMF de CD28 em linfócitos em LPS de *P gingivalis*

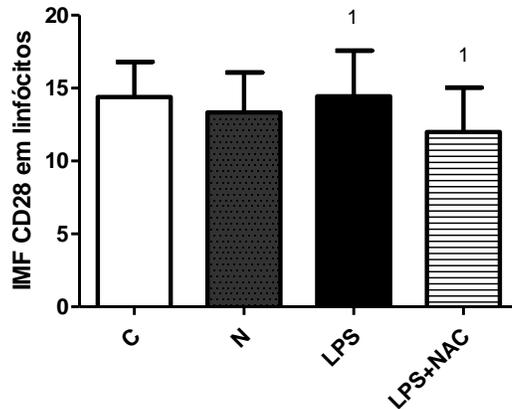


Figura 19: Análise por citometria de fluxo de moléculas de superfície em sangue total de indivíduos saudáveis periodontalmente. Amostras estimuladas com LPS de *P gingivalis* e tratadas com NAC diminuíram significativamente a intensidade média de fluorescência em linfócitos totais comparado com o grupo estimulado apenas. ¹indica uma diferença significativa entre os grupos . $P < 0,05$.

Como houve um aumento na ativação destas células frente ao estímulo com LPS, nos interessamos em avaliar a frequência de marcação de citocina IFN- γ . De forma interessante, NAC foi capaz de elevar significativamente a frequência de marcação de células CD8⁺ IFN- γ ⁺, a frequência de marcação de IFN em linfócitos totais e a frequência de marcação de IFN em linfócitos T CD8⁺ no grupo estimulado e tratado quando comparado com o grupo estimulado apenas (Figuras 20 a 22).

Figura 20: Análise citometria de CD8⁺IFN⁺ em LPS de *P gingivalis*

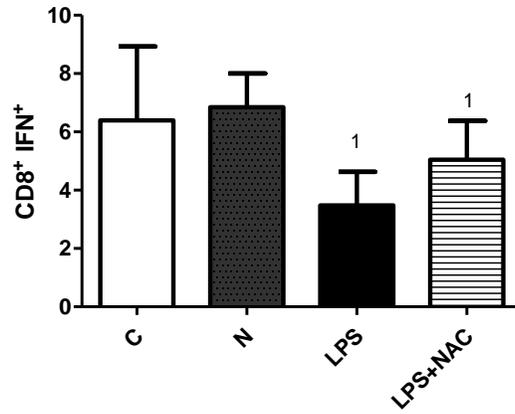


Figura 20: Análise por citometria de fluxo de citocinas de sangue total de indivíduos saudáveis periodontalmente. Amostras estimuladas com LPS de *P gingivalis* e tratadas com NAC elevaram significativamente a frequência de marcação de linfócitos T CD8⁺ IFN⁺ comparado com o grupo estimulado apenas. ¹indica uma diferença significativa entre os grupos. $P < 0,05$.

Figura 21: Análise citometria IFN em CD8⁺ em LPS de *P gingivalis*

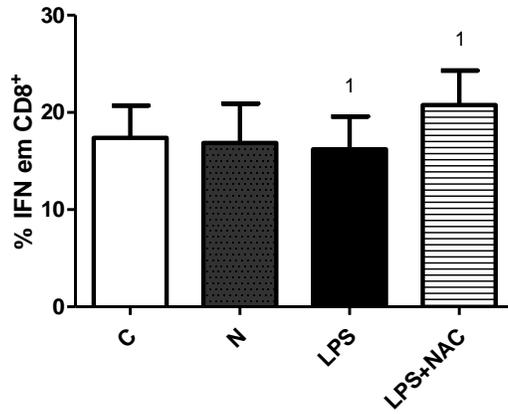


Figura 21: Análise por citometria de fluxo de citocinas de sangue total de indivíduos saudáveis periodontalmente. Amostras estimuladas com LPS de *P gingivalis* e tratadas com NAC elevaram significativamente a frequência de marcação de IFN em linfócitos T CD8⁺ comparado com o grupo estimulado apenas. ¹indica uma diferença significativa entre os grupos. $P < 0,05$.

Figura 22: Análise citometria de IFN em linfócitos:

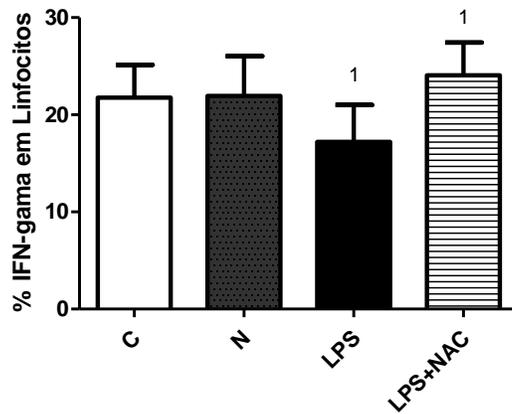


Figura 22: Análise por citometria de fluxo de citocinas de sangue total de indivíduos saudáveis periodontalmente. Amostras estimuladas com LPS de *P gingivalis* e tratadas com NAC elevaram significativamente a frequência de marcação de IFN em linfócitos totais comparado com o grupo estimulado apenas. ¹indica uma diferença significativa entre os grupos . $P < 0,05$.

7- DISCUSSÃO:

Os tecidos periodontais, uma vez desafiados por bactérias do biofilme subgengival, podem desenvolver uma resposta imune intensa e não controlada que pode acarretar no início e desenvolvimento da periodontite (VAN DYKE, 2008). O processo inflamatório crônico é uma característica da periodontite, onde uma falha ao retorno da homeostase favorece a liberação de mediadores inflamatórios como MMPs e RANKL que degradam tanto o tecido conjuntivo propriamente dito quanto o osso alveolar (GRAVES, 2008). Atualmente, tem-se buscado alternativas que possam promover um controle da resposta imune/inflamatória e o retorno da homeostase tecidual nas doenças periodontais (VAN DYKE, 2008; GARLET, 2010; GLOWACKI, *et al.* 2013; FREIRE e VAN DYKE, 2013).

Modelos de estudo são ferramentas essenciais para o estudo inicial dos efeitos de novas terapias e a relação da resposta do hospedeiro frente ao desafio. O modelo de estudo de periodontite experimental em camundongos é consagrado na literatura, sendo um modelo interessante, pois lança mão de um patógeno reconhecidamente periodontopatogênico e não utiliza de agentes externos (ligadura) que possam influenciar a resposta imune (GARLET, 2005).

Neste estudo, nos procuramos avaliar os efeitos de NAC da modulação da resposta inflamatória em modelo de estudo experimental de periodontite agressiva. NAC é uma variação acetilada de cisteína que é capaz de elevar os níveis de GSH e tem sido utilizado clinicamente em humanos e em modelos de

estudo no tratamento e controle da resposta imunológica (ROCHA-VIEIRA *et al.* 2003; VENKETARAMAN *et al.* 2003). Nosso grupo demonstrou que NAC sistêmico foi capaz de reduzir significativamente a lesão resultante da infecção com parasita *Leishmania major* em camundongos susceptíveis (ROCHA-VIEIRA *et al.*, 2003). Também, em modelo de perda óssea por ligadura em ratos diabéticos induzido por streptozotocin, NAC sistêmico foi capaz de diminuir significativamente a perda óssea (TOKER *et al.*, 2009).

Este é o primeiro estudo avaliando a ação de NAC na modulação da periodontite experimental induzida por bactéria periodontopatogênica. Nossos resultados demonstraram que NAC sistêmico foi capaz de diminuir a perda óssea alveolar neste modelo de estudo. O real efeito direto de NAC na diminuição da perda óssea nós não sabemos, contudo pode-se especular que NAC possa agir indiretamente através do controle da produção de RANKL. Este processo seria viável, pois NAC é regula a produção de NFκB, um indutor da ativação de RANKL (AMORE *et al.*, 2013; FINN e KEMP 2012). Além disto, NAC é capaz de reduzir a resposta de *bone marrow monocyte-macrophage lineage* a RANKL na diferenciação osteoclástica (LEE *et al.*, 2005). Alternativamente, o controle da perda óssea pode ser associado com a atividade de enzimas e citocinas que podem indiretamente influenciar o processo inflamatório. Para tentar verificar esta questão foi avaliado os efeitos de NAC na atividade de MPO e citocinas imunoregulatórias.

MPO é uma peroxidase produzida principalmente por neutrófilos que degrada bactérias e outros patógenos (KLEBANOFF, 2005). Contudo, níveis alterados de MPO podem degradar a matriz extracelular (LEE *et al.*, 1988). Elevados níveis MPO em fluido do sulco gengival tem sido correlacionados com periodontite crônica progressiva e estes níveis tendem a diminuir após o tratamento clínico (BORGES *et al.*, 2007; HÉRNANDEZ *et al.*, 2010). Além disto, o polimorfismo MPO-463G/A no gene MPO tem sido associado com o risco de desenvolver periodontite agressiva em pacientes turcos (ERCIYAS *et al.*, 2010). Neste estudo, nós demonstramos que atividade de MPO está significativamente elevada na maxila de animais infectados, o que está de acordo com prévio estudo (QUEIROZ-JUNIOR *et al.*, 2012). Contudo, em animais infectados e tratados com NAC, MPO foi reduzida significativamente quando comparado com animais infectados apenas. Sendo assim, NAC pode ser capaz de controlar em parte a destruição da matriz extracelular na doença periodontal através do controle da atividade de MPO.

Alterações nos níveis de GSH têm sido correlacionadas com doenças crônicas, incluindo doença periodontal (RAHMAN, 2005; CHAPPLE *et al.*, 2002). GSH reduzida é capaz de fazer o *booster* celular e reduzir compostos reativos do oxigênio (ROS) intracelular. Para isto, GSH reduzida é oxidada por ROS dimerizando com outra molécula de GSH e liberando água. Esta dimerização forma a GSSG (GSH oxidada) que pode ser reduzida a GSH novamente pela enzima GSH redutase através de NADPH. Desta forma, níveis aumentados de

GSSG são correlacionados com um estresse oxidativo (MEISTER, 1994). Estes níveis alterados de GSSG podem ser observados no fluido do sulco gengival na periodontite crônica (BORGES *et al.*, 2007). A literatura não tem demonstrado que bactérias periodontopatogênicas possam alterar o estado redox de GSSG. Neste estudo, nos observamos um aumento significativo de GSH total e GSSG em sangue periférico de camundongos infectados com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* quando comparado com animais infectados e tratados com NAC. Estes dados estão de acordo com aqueles observados em *reversible endotoxic shock* em ratos, onde foi mostrado um significativo aumento de GSH total e GSSG no fígado e plasma, até 48 horas após a indução com lipopolissacarídeos de *E. coli* (CATALA e PORTOLES, 2002). Desta forma, isto nos leva a entender que *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* possa alterar a capacidade redox de GSH em sangue periférico neste modelo de estudo.

Estudos tem demonstrado que citocinas induzidas pela resposta imune do hospedeiro estão associadas com o início da destruição dos tecidos periodontais (BAKER *et al.*, 1999; GRAVES *et al.*, 2011). Tem sido sugerido que a progressão da doença periodontal seja devida a uma combinação de fatores como a presença de bactérias periodontopatogênicas, elevados níveis de citocinas inflamatórias (i.e TNF- α , IL-1- β , IL-6 e IL-17), a produção e ativação de MMPs e RANKL e relativos baixos níveis de citocina modulatória IL-10 (GRAVES, 2008; SCHENKEIN *et al.*, 2010).

Animais que tiveram IL-6 deletado geneticamente demonstraram menor perda óssea causada pela infecção por *Porphyromonas gingivalis* quando comparado a animais selvagens (BAKER *et al.*, 1999). Contudo, neste estudo, não houve diferença significativa nos níveis de IL-6 em linfonodos cervicais nos diversos grupos. Outro estudo com modelo experimental similar também demonstrou não haver diferença significativa nos níveis de IL-6 no soro entre animais infectados e não infectados (QUEIROZ-JUNIOR *et al.*, 2012).

A citocina pró-inflamatória TNF- α tem uma relação significativa com a perda óssea nas doenças periodontais (GRAVES, 2008). O mecanismo pelo qual TNF- α induz a reabsorção óssea inflamatória inclui a ativação de células do estroma e osteoblasto para expressarem M-CSF e RANKL, além de induzir citocinas inflamatórias adicionais como IL-6 e IL-1- β para aumentar a osteoclastogênese e a reabsorção óssea (IVASHKIV *et al.*, 2011). Em modelo de ligadura em ratos, TNF- α humano recombinante acelerou a progressão da perda óssea (GASPERSIC *et al.*, 2003). Em camundongos TNF- α receptor-1-knockout e infectados com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foi observada uma significativa redução da perda óssea e inflamação (GARLET *et al.*, 2007). Por outro lado, IL-10 potencialmente inibe a expressão de RANKL induzida por NFATc1 e assim suprime a diferenciação osteoclástica e a indução de reabsorção óssea (IVASHKIV *et al.*, 2011).

Nós observamos que animais infectados com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e não tratados com NAC houve um significativo aumento

nos níveis de TNF- α em linfócitos totais e em linfócitos T CD4⁺ de linfonodos cervicais. Este resultado é similar aquele observado por dados obtidos com a técnica de ELISA em maxila (QUEIROZ-JUNIOR *et al.*, 2012). Em contrapartida, IL-10, em células apresentadoras de antígeno e a intensidade média de fluorescência de IL-10 em células apresentadoras de antígenos e linfócitos T CD4⁺, foi marcadamente diminuída em camundongos infectados e não tratado com NAC quando comparado com animais não infectados. Este dado está de acordo com prévio estudo que demonstrou não haver mRNA para IL-10 na maxila de camundongos até 15 dias após a infecção com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (GARLET *et al.*, 2005).

Entretanto, nos demonstramos que, em animais infectados e tratados com NAC, houve redução significativa nos níveis da citocina inflamatória TNF- α em células apresentadoras de antígeno, em linfócitos totais e em linfócitos T CD4⁺ quando comparados com animais infectados apenas. Além disto, NAC foi capaz de restabelecer os níveis da citocina modulatória IL-10 em linfócitos totais, em linfócitos T CD4⁺, bem como a porcentagem de células T CD4⁺ IL10⁺ quando comparado com animais infectados apenas. Outro dado interessante foi observar que NAC elevou significativamente a razão IL-10/TNF- α em células apresentadoras de antígeno, em linfócitos totais e em linfócitos T CD4⁺. Estes dados em conjunto sugerem que NAC pode exercer um efeito modulatório na resposta imune durante o desenvolvimento da periodontite experimental em camundongos.

A citocina pró-inflamatória IL-17 é descrita como um indutor da produção de RANKL (SATO *et al.*, 2006) e estudos em humanos sugerem sua superexpressão em tecidos de pacientes com periodontite crônica (CARDOSO *et al.*, 2009; ADIBRAD *et al.*, 2012). Nós demonstramos, neste modelo de estudo, que IL-17 está significativamente elevada em linfócitos totais e em células CD4⁺ IL-17⁺ de linfonodo cervical de camundongos infectados quando comparado com animais não infectados. Mais uma vez, NAC foi capaz de modular uma citocina de perfil inflamatório ao diminuir a frequência de marcação de IL-17 em linfócitos totais e em células T CD4⁺ IL-17⁺ quando comparado com animais infectados apenas.

Apesar de níveis elevados de IFN- γ estarem presente em tecidos periodontais inflamados, esta citocina inflamatória é considerada um importante citocina para induzir a ativação de macrófagos para a fagocitose de patógenos e de antígenos, produção de outras citocinas, quimiocinas e moléculas microbidas (GARLET, 2010). De fato, nossos resultados demonstraram que não houve diferença estatística na produção de IFN- γ em linfócitos totais e em linfócitos T CD4⁺ entre todos os grupos, bem como não houve diferença significativa da marcação de IFN- γ em linfócitos T CD8⁺ entre o grupo infectado e o grupo controle. Contudo, ao tratarmos os animais com NAC, estes demonstraram um aumento significativo da marcação e da intensidade média de fluorescência de IFN- γ em linfócitos T CD8⁺. Isto pode ser explicado pelo fato de que *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pode se internalizar em células orais

(MEYER *et al.*, 1999) e assim apresentar antígenos por MHC de classe I para células citotóxicas CD8⁺, aumentando a produção de IFN- γ por estas células.

Doenças periodontais são infecções polimicrobianas que induzem a uma resposta imune que poderá ser descontrolada acarretando na destruição dos tecidos que envolvem os dentes. Apesar de haver mais de 700 espécies bacterianas presentes no sulco subgingival, apenas poucas espécies estão efetivamente envolvidas na indução e progressão da doença. A grande maioria são comensais e importantes para manutenção de uma flora bacteriana oral. Bactérias específicas como *Aa*, *P gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* estão fortemente associadas com lesões periodontais avançadas por medidas clínicas. Estas bactérias citadas são anaeróbias e três delas fazem parte do complexo vermelho (*P gingivalis*, *T denticola* e *T forsythia*), sendo frequentemente encontradas juntas em sítios periodontais, promovendo interações entre si facilitando a cultura do ambiente anaeróbio e produzindo vários fatores de virulência que são capazes de desfazer o estado homeostático dos tecidos periodontais, promovendo uma resposta imunodestrutiva do hospedeiro (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2005). *Aa* está presente em cerca de 5% das bolsas periodontais, entretanto trata-se de um microorganismo altamente virulento, produzindo uma gama de proteases e linfocinas que induzem a uma rápida destruição dos tecidos periodontais. Esta bactéria tem sido intimamente relacionada com formas agressivas de periodontite (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2005). *P gingivalis* está envolvido com periodontite crônica avançada e é o

patógeno periodontal mais estudado. LPS de *P gingivalis* é marcadamente um antígeno com capacidade de induzir uma forte resposta imune inflamatória, bem como perda óssea alveolar (HOLT *et al.*, 1999). Além disto, *P gingivalis* e *T denticola* formam uma relação sinérgica quando incubadas juntas (KURAMITSU *et al.*, 2005). Em modelo murinho de pneumonia, Infecções mistas de *P gingivalis* e *T denticola* desenvolvem uma resposta inflamatória muito mais pronunciada que em monoinfecções (KIMIZUKA *et al.*, 2003).

Terapias sistêmicas com antimicrobianos e antibióticos tem demonstrado eficácia no controle de patógenos periodontais, entretanto, seu uso é limitado, pois seu uso elimina a flora indígena e em longo prazo pode gerar resistência bacteriana tanto local, quanto sistêmica (VAN WINKELHOFF *et al.*, 1996). Desta forma, adjuvantes que possam auxiliar o hospedeiro a controlar patógenos periodontais são interessantes. Por estes motivos, avaliamos quando NAC poderia ser diretamente prejudicial a microorganismos periodontais, bem como procuramos avaliar os efeitos modulatórios de NAC em sangue periférico de pacientes saudáveis periodontalmente em monoinfecção ou polinfecção com bactérias periodontopatogênicas e LPS de *P gingivalis*.

Neste estudo, avaliamos a ação direta de NAC em varias concentrações em cultura de três bactérias periodontopatogênicas: *Aa*, *P gingivalis* e *T denticola*. Este experimento foi feito em triplicata em dois tempos diferentes. Apesar de não termos obtido um dado estatístico, de acordo com a projeção dos gráficos, podemos supor que NAC não influencia na cultura destas bactérias analisadas.

Isto está de acordo com outros estudos que avaliaram a ação de NAC em outros patógenos (MORRIS *et al.*, 2013). Entretanto, NAC tem mostrado ação adjuvante no tratamento contra diversos patógenos (SILVEIRA *et al.*, 2013; KARBASI *et al.*, 2013). Interessantemente, recentes estudos tem avaliado a ação de NAC na desagregação de biofilmes bacterianos. Implantes ortopédicos frequentemente são infectados por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Estas bactérias formam um biofilme na estrutura da prótese acarretando em complicações clínicas. Em um ensaio *in vitro* com biofilme formado por estas bactérias em discos de titânio jateado e poliestireno, NAC foi capaz de desagregar os biofilmes após três horas de incubação (DRAGO *et al.*, 2013). Desta forma, terapia local com NAC pode ter um efeito benéfico para o hospedeiro periodontal, não destruindo a flora bactéria indígena, sendo coadjuvante de outras terapias e desagregando biofilme bacteriano.

De forma interessante, sangue periférico de humanos estimulados com monoinfecção, poliinfecção e LPS, tratamento com NAC não modulou de forma significativa a citocina IL-10 em todas as populações, apesar haver uma elevação da frequência de marcação de IL-10 em monócitos CD14⁺ tratados com NAC e infectados quando comparado com o grupo infectado apenas. Isto pode ser parcialmente explicado pelo fato que NAC inicialmente estimula um perfil de resposta imune Th1 (PETERSON *et al.*, 1989), onde o IFN- γ é a citocina de assinatura. Além disto, nosso tempo de infecção foi de 18 horas. Provavelmente, com um tempo maior de estímulo aliado a uma diminuição da ativação linfocitária,

possa ser possível observar uma elevação de IL-10, como no modelo murinho. Dados similares aos nossos puderam ser observados em um recente estudo. Células THP-1 foram estimuladas com diversas concentrações de LPS de *E coli* e tratadas antes e depois com NAC 15mM. A expressão de IL-10 e outras citocinas foram avaliadas em vários tempos até o tempo máximo de 24 horas. IL-10 e RNAm de IL-10 no grupo estimulado foram super expressos em vários tempos, contudo, nos grupos tratados com NAC, tanto estimulados como controle, IL-10 e RNAm de IL-10 foram suprimidas. Para estes autores, macrófagos ativado pelo estímulo de LPS tem a ativação de NF- κ B inibida por NAC, diminuindo a síntese de citocinas como IL-10. Em células RAW (precuroras de osteoclastos) estimuladas com LPS, NAC também inibiu a expressão de IL-10 (SONG *et al.*, 2004).

Nossos dados avaliando sangue periférico estimulado por monoinfecção, poliinfecção e LPS confirmaram que tratamento com NAC induz a uma polarização primária mediada por perfil Th1. NAC em sangue estimulado foi capaz de aumentar significativamente a frequência de marcação de IFN- γ em linfócitos totais e em linfócitos T CD8⁺ comparado com o grupo estimulado apenas. Também, pôde ser visto um aumento significativo da frequência de marcação de células T CD8⁺ IFN⁺ no grupo tratado com NAC e estimuladas, comparado com o grupo estimulado apenas. Esta resposta inicial com aumento de IFN- γ é uma característica de NAC (PETERSON *et al.*, 1998). Isto é importante em doenças infecciosas, pois auxilia no controle de patógenos por uma melhor ativação de

macrófagos. O controle inicial de patógenos periodontais como o *P gingivalis* é fundamental, pois tem-se observado que repetidas infecções com esta bactéria mantêm um estado de resposta por linfócitos T Th2 dominante, atrasando a sua eliminação. (KATO *et al.*, 2008).

A molécula coestimulatória CD28 é uma proteína de membrana de linfócito T que atua em conjunto com TCR para transmitir os sinais necessários para uma ativação eficiente destas células. Em biopsias de tecidos gengivais de doadores saudáveis periodontalmente e/ou gengivite e pacientes com periodontite, Gemmell *et al.* (2001), não encontraram diferença estatística na porcentagem de células CD28⁺ entre os grupos. Da mesma forma, não tem sido demonstradas diferenças na frequência de células CD28⁺ em sangue periférico de pacientes com periodontite comparado com pacientes com saudáveis (AOYAGI *et al.*, 2000). Além disto, não tem sido observada diferença da ocorrência de polimorfismo no gene para CD28 +17 (T/C) entre pacientes saudáveis periodontalmente e pacientes com periodontite; entretanto houve uma maior frequência do genótipo T em periodontite agressiva comparada com periodontite crônica, sugerindo que o alelo C relaciona-se a susceptibilidade a periodontite agressiva (e SILVA *et al.*, 2013). Poucos trabalhos têm avaliado a resposta fenotípica de CD28 em associação com estímulo de bactérias periodontopatogênicas. Nossos dados mostraram que monoinfecção e poliinfecção na presença de *P gingivalis* foram capaz de induzir a uma ativação significativa em linfócitos T CD4⁺ comparados com o controle. Isto é um dado interessante, pois tem sido demonstrado que

infecções repetidas com *Porphyromonas gingivalis* podem induzir a um perfil de resposta Th2, atrasando a eliminação deste microorganismo (KATO, *et al.*, 2008). Contudo, não observamos alteração de citocina relacionada ao perfil Th2, possivelmente por um tempo curto de infecção. Ao analisarmos a ação de NAC na ativação por molécula coestimulatória CD28 em monoinfecção e poliiinfecção observamos uma ativação significativa em células T CD4⁺ e células T CD8⁺ pela diminuição da intensidade média de fluorescência comparada com o grupo estimulado apenas, principalmente na presença de *P. gingivalis*. Assim, parece que NAC favorece uma ativação inicial mais eficaz nestas células na presença de microorganismos periodontopatogênicos em sangue periférico de pacientes saudáveis.

Desta forma, decidimos investigar o quanto NAC poderia ativar linfócitos de sangue periférico sob estímulo de LPS de *P. gingivalis*. De uma forma interessante, diferente do que foram observados com bactérias viáveis, nossos dados não demonstraram uma diferença significativa na expressão e intensidade média de fluorescência de CD28 nas populações de linfócitos do grupo controle e o do grupo estimulado com LPS de *P. gingivalis*. Trata-se também de um dado interessante, pois *P. gingivalis* pode induzir uma ativação indireta de linfócitos por antígenos específicos, como por exemplo, pelo antígeno gingipain (uma cisteína protease que possui importante fator de virulência) e não por LPS. De fato, um estudo demonstrou que o desafio com gingipain em monócitos do sangue periférico significativamente sobre regulou CD28 (YUN *et al.*, 2005).

Nós observamos que tratamento de NAC em sangue estimulado com LPS de *P gingivalis* demonstrou uma diminuição significativa da frequência de linfócitos T CD8⁺ CD28⁺ comparado com o grupo estimulado apenas. Sendo assim, de acordo com estes dados, apesar LPS de *P gingivalis* não ter induzido a uma ativação de linfócitos, ao tratar estas células previamente com NAC, uma ativação mais eficaz de linfócitos T CD8⁺ pode ser alcançada. Apesar de não demonstrar diferença estatística, linfócitos T CD4⁺ tratados com NAC e estimulados com LPS demonstraram uma menor marcação de CD28 que o grupo estimulado apenas ($p=0.06$).

8- RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO:

- O tratamento com NAC em camundongos infectados com bactéria periodontal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foi capaz de reduzir a perda óssea alveolar comparado com animais infectados;
- O tratamento com NAC em camundongos infectados com bactéria periodontal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foi capaz de diminuir a atividade de MPO em maxila de camundongos comparado com animais infectados;
- Tratamento com NAC diminuiu o estresse oxidativo em sangue periférico de animais infectados com bactéria periodontal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* comparado com controle;
- Tratamento com NAC foi capaz de modular negativamente citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-17 em linfonodo de camundongos comparado com animais infectados;
- Tratamento com NAC foi capaz de modular positivamente citocina IFN- γ em linfonodo de camundongos comparado com animais infectados;
- Tratamento com NAC foi capaz de modular positivamente citocina modulatória IL-10 em linfonodo de camundongos comparado com animais infectados;
- Tratamento com NAC melhorou a ativação de linfócitos T CD 8⁺ traduzido pela molécula co-estimulatória CD28 em sangue total de humanos saudáveis periodontalmente e estimulados por bactéria periodontopatogênicas ou LPS comparado com grupo infectado apenas;

- Tratamento com NAC elevou os níveis de IFN- γ em linfócitos T CD8⁺ em sangue total de humanos saudáveis periodontalmente e estimulados por bactéria periodontopatogênicas ou LPS comparado com grupo infectado apenas.

Nossos dados indicam que NAC modula a resposta imune em modelo de doença periodontal e infecção com bactérias periodontopatogênicas e é capaz de inibir a perda óssea, sugerindo um potencial papel para NAC na prevenção da doença periodontal.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AAP. Consensus report in prevention. *Annals Periodontol.* 1996;1(1):250-255.
2. AAP. Parameter on plaque-induced gingivitis. *J Periodontol.* 2000; 71(5s):851-852.
3. AAP. Parameter on chronic periodontitis with slight to moderate loss of periodontal support. *J Periodontol.* 2000; 71(5s):853-855.
4. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular.* 6ª ed. Rio de Janeiro: *Saunders/Elsevier*, 2008. 564pp.
5. Adibrad M, Deyhimi P, Ganjalikhani Hakemi M, Behfarnia P, Shahabuei M, Rafiee L. Signs of the presence of Th17 cells in chronic periodontal disease. *J Periodontal Res* 2012 Aug;47(4):525-531.
6. Amore A, Formica M, Giacchino F, Gigliola G, Bonello F, Conti G, Camilla R, Coppo R. N-Acetylcysteine in hemodialysis diabetic patients resets the activation of NF-kB in lymphomonocytes to normal values. *J Nephrol.* 2013 Jul-Aug;26(4):778-86.
7. Aoyagi T, Yamazaki K, Kabasawa-Katoh Y, Nakajima T, Yamashita N, Yoshie H, Hara K. Elevated CTLA-4 expression on CD4 T cells from periodontitis patients stimulated with *Porphyromonas gingivalis* outer membrane antigen. *Clin Exp Immunol.* 2000 Feb;119(2):280-6.

8. Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A*. 2008 Nov;73(11):975-83.
9. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals Periodontol*. 1999;4(1):1-6.
10. Asai Y, Ohyama Y, Gen K, Ogawa T. Bacterial fimbriae and their peptides activate human gingival epithelial cells through Toll-like receptor 2. *Infect Immun*. 2001 Dec;69(12):7387-95.
11. Baker PJ, Boutaugh NR, Tiffany M, Roopenian DC. B Cell IgD deletion prevents alveolar bone loss following murine oral infection. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2009;2009:864359.
12. Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC. CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun*. 1999 Jun;67(6):2804-2809.
13. Bartold PM, Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol 2000*. 2006;40:29-49.
14. Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Grgan C, Sorsa T, Kontinen YT. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J Dent Res*. 2007 Apr;86(4):347-51.
15. Berglundh T, Liljenberg B, Lindhe J. Some cytokine profiles of T-helper cells in lesions of advanced periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2002;29(8):705-709.

16. Bilzer M, Lauterburg BH. Glutathione metabolism in activated human neutrophils: stimulation of glutathione synthesis and consumption of glutathione by reactive oxygen species. *Eur J Clin Invest.* 1991;21(3):316-322.
17. Bodet C, Grenier D. Synergistic effects of lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria on pro-inflammatory cytokine production in an ex vivo whole blood model. *Mol Oral Microbiol.* 2010 Apr;25(2):102-11.
18. bone physiology. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Nov;1143:123-50.
19. Borges I Jr, Moreira EA, Filho DW, de Oliveira TB, da Silva MB, Fröde TS. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. *Mediators Inflamm* 2007;2007:45794.
20. Cardoso CR, Garlet GP, Crippa GE, Rosa AL, Júnior WM, Rossi MA, Silva JS. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24(1):1-6.
21. Catalá M, Portolés MT. Action of E. coli endotoxin, IL-1beta and TNF-alpha on antioxidant status of cultured hepatocytes. *Mol Cell Biochem.* 2002 Feb;231(1-2):75-82.
22. Chapple IL, Brock G, Eftimiadi C, Matthews JB. Glutathione in gingival crevicular fluid and its relation to local antioxidant capacity in periodontal health and disease. *Mol Pathol* 2002 Dec;55(6):367-373.

23. Cortelli JR, Cortelli SC, Pallos D, Jorge AO. Prevalence of aggressive periodontitis in adolescents and young adults from Vale do Paraíba. *Pesqui Odontol Bras.* 2002;16(2):163-168.
24. D'Alonzo M, Martincich L, Biglia N, Pisacane A, Maggiorotto F, Rosa GD, Montemurro F, Kubatzki F, Sismondi P, Ponzzone R. Clinical and radiological predictors of nipple-areola complex involvement in breast cancer patients. *Eur J Cancer.* 2012 Oct;48(15):2311-8.
25. Danks L, Takayanagi H. Immunology and bone. *J Biochem.* 2013 Jul;154(1):29-39.
26. Drago L, De Vecchi E, Mattina R, Romanò CL. Activity of N-acetyl-L-cysteine against biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on orthopedic prosthetic materials. *Int J Artif Organs.* 2013 Jan;36(1):39-46.
27. Dröge W, Breitkreutz R. Glutathione and immune function. *Proc Nutr Soc.* 2000;59(4):595-600.
28. Dröge W, Eck HP, Gmünder H, Mihm S. Modulation of lymphocyte functions and immune responses by cysteine and cysteine derivatives. *Am J Med.* 1991; 91(3c):140s-144s.
29. Dröge W, Schulze-Osthoff K, Mihm S, Gadifk D, Schenk H, Eck HP, Roth S, Gmünder H. Function of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J.* 1994;8:1331-1338.

30. Dutra WO, Colley DG, Pinto-Dias JC, Gazzinelli G, Brener Z, Pereira ME, Coffman RL, Correa-Oliveira R, Carvalho-Parra JF. Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5+ B cells or activated T cells of chagasic patients, respectively. *Scand J Immunol.* 2000;51(1):91-97.
31. e Silva MR, Moreira PR, da Costa GC, Saraiva AM, de Souza PE, Amormino SA, da Costa JE, Gollob KJ, Dutra WO. Association of CD28 and CTLA-4 gene polymorphisms with aggressive periodontitis in Brazilians. *Oral Dis.* 2013 Sep;19(6):568-76.
32. Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ; CDC Periodontal Disease Surveillance workgroup: James Beck (University of North Carolina, Chapel Hill, USA), Gordon Douglass (Past President, American Academy of Periodontology), Roy Page (University of Washin). Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res.* 2012;91(10):914-920.
33. Erciyas K, Pehlivan S, Sever T, Orbak R. Genetic variation of myeloperoxidase gene contributes to aggressive periodontitis: a preliminary association study in Turkish population. *Dis Markers.* 2010;28(2):95-99.
34. Finn NA, Kemp ML. Pro-oxidant and antioxidant effects of N-acetylcysteine regulate doxorubicin-induced NF-kappa B activity in leukemic cells. *Mol Biosyst* 2012 Feb;8(2):650-662.

35. Freire MO, Van Dyke TE. Natural resolution of inflammation. *Periodontol* 2000. 2013 Oct;63(1):149-64.
36. Fukaura H, Kent SC, Pietrusewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL, Hafler DA. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor- β 1-secreting Th3 cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest*. 1996;98(1):70-77.
37. Gaffen SL, Hajishengallis G. A new inflammatory cytokine on the block: rethinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *J Dent Res*. 2008;87(9):817-828.
38. Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, Silva JS. The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clin Exp Immunol* 2007 Jan;147(1):128-138.
39. Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Garlet TP, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, Silva JS. The essential role of IFN-gamma in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *Microbes Infect* 2008 Apr;10(5):489-496.
40. Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, Silva JS. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

- through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol*. 2006 Feb;21(1):12-20.
41. Garlet GP, Martins W Jr, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2004 Aug;31(8):671-9.
42. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res*. 2010 Dec;89(12):1349-1363.
43. Gaspersic R, Stiblar-Martincic D, Osredkar J, Skaleric U. In vivo administration of recombinant TNF-alpha promotes bone resorption in mice. *J Periodontol Res*. 2003 Aug;38(4):446-448.
44. Gemmell E, Carter CL, Hart DN, Drysdale KE, Seymour GJ. Antigen-presenting cells in human periodontal disease tissues. *Oral Microbiol Immunol*. 2002 Dec;17(6):388-93.
45. Gemmell E, Drysdale KE, Seymour GJ. Gene expression in splenic CD4 and CD8 cells from BALB/c mice immunized with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol*. 2006;77(4):622-633.
46. Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. *Periodontology 2000*. 2007;43:14-40.

47. Gjermeo P, Rösing CK, Susin C, Oppermann R. Periodontal diseases in Central and South America. *Periodontol 2000*. 2002;29:70-78.
48. Glowacki AJ, Yoshizawa S, Jhunjhunwala S, Vieira AE, Garlet GP, Sfeir C, Little SR. Prevention of inflammation-mediated bone loss in murine and canine periodontal disease via recruitment of regulatory lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013 Nov 12;110(46):18525-18530.
49. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2008 Aug;79(8 Suppl):1585-1591.
50. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response
51. Gurbuz N, Ozkul A, Burgaz S. Effects of vitamin C and N-acetylcysteine against cyclophosphamide-induced genotoxicity in exfoliated bladder cells of mice in vivo. *J BUON*. 2009 Oct-Dec;14(4):647-52.
52. Hamilos DL, Wedner HJ. The role of glutathione in lymphocyte activation. I. Comparison of inhibitory effects of buthionine sulfoximine and 2-cyclohexene-1-one by nuclear size transformation. *J Immunol*. 1985;135(4):2740-2747.
53. Han X, Kawai T, Eastcott JW, Taubman MA. Bacterial-responsive B lymphocytes induce periodontal bone resorption. *J Immunol*. 2006 Jan 1;176(1):625-31.

54. Han X, Lin X, Seliger AR, Eastcott J, Kawai T, Taubman MA. Expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand by B cells in response to oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol*. 2009 Jun;24(3):190-6.
55. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunology*. 2005;6(11):1123-1132.
56. Hernández M, Gamonal J, Tervahartiala T, Mäntylä P, Rivera O, Dezerega A, Dutzan N, Sorsa T. Associations between matrix metalloproteinase-8 and -14 and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid from subjects with progressive chronic periodontitis: a longitudinal study. *J Periodontol*. 2010 Nov;81(11):1644-1652.
57. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000*. 1999 Jun;20:168-238.
58. in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*. 2011 Jan 17;3.
59. Ivashkiv LB, Zhao B, Park-Min KH, Takami M. Feedback inhibition of osteoclastogenesis during inflammation by IL-10, M-CSF receptor shedding, and induction of IRF8. *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Nov;1237:88-94.
60. Karbasi A, Hossein Hosseini S, Shohrati M, Amini M, Najafian B. Effect of oral N-acetyl cysteine on eradication of *Helicobacter pylori* in patients with dyspepsia. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2013 Mar;59(1):107-12.

61. Kato C, Mikami M, Natsuno T. Participation of glutathione in the elimination of *Porphyromonas gingivalis* in vivo. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23:441-448.
62. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, Goncalves RB, Valverde P, Dibart S, Li YP, Miranda LA, Ernst CW, Izumi Y, Taubman MA. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol*. 2006 Sep;169(3):987-98.
63. Kim do Y, Jun JH, Lee HL, Woo KM, Ryoo HM, Kim GS, Baek JH, Han SB. N-acetylcysteine prevents LPS-induced pro-inflammatory cytokines and MMP2 production in gingival fibroblasts. *Arch Pharm Res*. 2007; 30(10): 1283-1292.
64. Kimizuka R, Kato T, Ishihara K, Okuda K. Mixed infections with *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* cause excessive inflammatory responses in a mouse pneumonia model compared with mono-infections. *Microbes Infect*. 2003 Dec;5(15):1357-62.
65. Kinane DF, Berglundh T, Lindhe J. Interações entre parasita e hospedeiro na doença periodontal. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP. Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara/Koogan, 2005. p.148-175.
66. Kinscherf R, Fischbach T, Mihm S, Roth S, Hohenhaus-Sievert E, Weiss C, Edler L, Bärtsch P, Dröge W. Effect of glutathione depletion and oral N-

- acetyl-cysteine treatment on CD4+ and CD8+ cells. *FASEB J.* 1994;8(6):448-451.
67. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol.* 2005 May;77(5):598-625.
68. Kumar V, Stellrecht K, Sercarz E. Inactivation of T cell receptor peptide-specific CD4 regulatory T cells induces chronic experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Exp Med.* 1996;184:1609-1617.
69. Kuramitsu HK, Chen W, Ikegami A. Biofilm formation by the periodontopathic bacteria *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol.* 2005 Nov;76(11 Suppl):2047-51.
70. Lang N, Bartold PM, Cullinan M, Jeffcoat M, Mombelli A, Murakami S, Page R, Papapanou P, Tonetti M, Van Dyke T. Consensus report: Aggressive periodontitis. *Ann Periodontol.* 1999. 4(1) 53.
71. Lee DG, Cho BH, Hervey J, Daynes RA. The role of neutrophils in tissue localized cell-mediated immunologic responses: I. The intensity of contact-type and delayed-type hypersensitivity responses may be influenced by the extent of extracellular matrix degradation by neutrophil proteases. *Reg Immunol* 1988 Nov-Dec;1(3):149-162.
72. Lee NK, Choi YG, Baik JY, Han SY, Jeong DW, Bae YS, Kim N, Lee SY. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood.* 2005 Aug 1;106(3):852-859.

73. Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and
74. Löe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol*. 1986 May;13(5):431-45.
75. Madeira MF, Queiroz-Junior CM, Costa GM, Santos PC, Silveira EM, Garlet GP, Cisalpino PS, Teixeira MM, Silva TA, Souza Dda G. MIF induces osteoclast differentiation and contributes to progression of periodontal disease in mice. *Microbes Infect* 2012 Feb;14(2):198-206.
76. Mahanonda R, Pichyangkul S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontol 2000*. 2007;43:41-55.
77. Meister A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res*. 1994;54(7):1969-1975.
78. Meyer DH, Rose JE, Lippmann JE, Fives-Taylor PM. Microtubules are associated with intracellular movement and spread of the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*. 1999 Dec;67(12):6518-6525.
79. Morris D, Khurasany M, Nguyen T, Kim J, Guilford F, Mehta R, Gray D, Saviola B, Venketaraman V. Glutathione and infection. *Biochim Biophys Acta*. 2013 May;1830(5):3329-49.

80. Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145-173.
81. Myneni SR, Settem RP, Connell TD, Keegan AD, Gaffen SL, Sharma A. TLR2 signaling and Th2 responses drive *Tannerella forsythia*-induced periodontal bone loss. *J Immunol.* 2011 Jul 1;187(1):501-9.
82. Navath RS, Wang B, Kannan S, Romero R, Kannan RM. Stimuli-responsive star poly(ethylene glycol) drug conjugates for improved intracellular delivery of the drug in neuroinflammation. *J Control Release.* 2010 Mar 19;142(3):447-56.
83. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000.* 1997; 14:9-11.
84. Papapanou PN, Engebretson SP, Lamster IB. Current and future approaches for diagnosis of periodontal diseases. *N Y State Dent J.* 1999;65(4):32-37.
85. Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh C. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Immunology.* 1998;95:3071-3076.
86. Petit MD, Hovenkamp E, Hamann D, Roos MT, van der Velden U, Miedema F, Loos BG. Phenotypical and functional analysis of T cells in periodontitis. *J Periodontal Res.* 2001;36(4):214-220.

87. Queiroz-Junior CM, Madeira MF, Coelho FM, de Oliveira CR, Cândido LC, Garlet GP, Teixeira MM, de Souza Dda G, Silva TA. Experimental arthritis exacerbates *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced periodontitis in mice. *J Clin Periodontol.* 2012;39(7):608-616.
88. Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J.* 2000;16(3):534-554.
89. Rocha-Vieira E, Ferreira E, Vianna P, De Faria DR, Gaze ST, Dutra WO, Gollob KJ. Histopathological outcome of *Leishmania major*-infected BALB/c mice is improved by oral treatment with N-acetyl-L-cysteine. *Immunology.* 2003;108:401-408.
90. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, Tanaka S, Kodama T, Akira S, Iwakura Y, Cua DJ, Takayanagi H. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med.* 2006 Nov 27;203(12):2673-82.
91. Schenkein HA, Koertge TE, Brooks CN, Sabatini R, Purkall DE, Tew JG. IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. *J Dent Res.* 2010 Sep;89(9):943-947.
92. Silveira LF, Baca P, Arias-Moliz MT, Rodríguez-Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of alexidine alone and associated with N-acetylcysteine against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Int J Oral Sci.* 2013 Sep;5(3):146-9.

93. Socransky SS, Haffajee AD. Microbiologia da doença periodontal. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP. Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara/Koogan, 2005. p.105-147.
94. Song M, Kellum JA, Kaldas H, Fink MP. Evidence that glutathione depletion is a mechanism responsible for the anti-inflammatory effects of ethyl pyruvate in cultured lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Jan;308(1):307-16.
95. Spagnuolo G, D'Antò V, Cosentino C, Schmalz G, Schweikl H, Rengo S. Effect of N-acetyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. *Biomaterials*. 2006 Mar;27(9):1803-9.
96. Suárez LJ, Ocampo AM, Dueñas RE, Rodríguez A. Relative proportions of T-cell subpopulations and cytokines that mediate and regulate the adaptive immune response in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2004;75(9):1209-1215.
97. Suresh R, Mosser DM. Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology. *Adv Physiol Educ*. 2013 Dec;37(4):284-91.
98. Takayanagi H, Sato K, Takaoka A, Taniguchi T. Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. *Immunol Rev*. 2005 Dec;208:181-93.

99. Teng YT. Mixed periodontal Th1-Th2 cytokine profile in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-specific osteoprotegerin ligand (or RANK-L)-mediated alveolar bone destruction in vivo. *Infect Immun.* 2002 Sep;70(9):5269-73.
100. Toker H, Ozdemir H, Eren K, Ozer H, Sahin G. N-acetylcysteine, a thiol antioxidant, decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J. Periodontol.* 2009;80(4):672-678.
101. Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res.* 2003;82(2):82-90.
102. Van Dyke TE. The management of inflammation in periodontal disease. *J Periodontol.* 2008;79(8 Suppl):1601-1608.
103. van Winkelhoff AJ, Rams TE, Slots J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol 2000.* 1996 Feb;10:45-78.
104. Venketaraman V, Dayaram YK, Amin AG, Ngo R, Green RM, Talaue MT, Mann J, Connell N. Role of glutathione in macrophage control of mycobacteria. *Infection and Immunity.* 2003; 71(4): 1864-1871.
105. Verhasselt V, Vanden Berghe W, Vanderheyde N, Willems F, Haegeman G, Goldman M. N-acetyl-L-cysteine inhibits primary human T cell responses at the dendritic cell level: association with NF-kappaB inhibition. *J Immunol.* 1999 Mar 1;162(5):2569-74.

106. Verstappen J, Von den Hoff JW. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *J Dent Res.* 2006 Dec;85(12):1074-84.
107. Vianna P. Imunorregulação na leishmaniose: papel da glutatona. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. 2005. 89pp.
108. Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012 Dec 15;380(9859):2163-96.
109. Wang CS, Dong Z. [Expression of toll-like receptor mRNA in epithelial cell of nasal mucosa]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi.* 2003 Aug;38(4):243-6.
110. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest.* 2005 Feb;115(2):282-90.
111. Wuyts WA, Vanaudenaerde BM, Dupont LJ, Demedts MG, Verleden GM. N-acetylcysteine reduces chemokine release via inhibition of p38 MAPK in human airway smooth muscle cells. *Eur Respir J.* 2003;21(1):43-49.
112. Yamamoto M, Fujihashi K, Hiroi T, McGhee JR, Van Dyke TE, Kiyono H. Molecular and cellular mechanisms for periodontal diseases: role of Th1 and Th2 type cytokines in induction of mucosal inflammation. *J Periodontal Res.* 1997 Jan;32(1 Pt 2):115-9.

113. Yun PL, Decarlo AA, Chapple CC, Collyer CA, Hunter N. Binding of *Porphyromonas gingivalis* gingipains to human CD4(+) T cells preferentially down-regulates surface CD2 and CD4 with little affect on co-stimulatory molecule expression. *Microb Pathog.* 2005 Feb-Mar;38(2-3):85-96.

10- ANEXOS:**Anexo I: Artigo corrigido e resubmetido para a Revista Oral Diseases**

02-Feb-2014

Dear Author of "Immunoregulation in periodontal disease: towards alternative strategies of prevention",

The manuscript entitled "Immunoregulation in periodontal disease: towards alternative strategies of prevention" has been submitted by Prof. Walderez Dutra to Oral Diseases and is presently being given full consideration for publication.

You have been listed as author for the manuscript. If this is not the case, please reply to this email.

Sincerely,

Michael Willis
Oral Diseases Editorial Office

Title: Immunoregulation in periodontal disease: towards alternative strategies of prevention

Running title: Immunoregulation to prevent periodontal disease

Leonardo Silveira Damasceno¹, Kenneth J. Gollob^{2,3} and Walderez Ornelas Dutra^{1,3}

¹ Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais

² Instituto de Ensino e Pesquisa, Hospital Santa Casa-BH

³ Instituto Nacional de Ciencia e Tecnologia em Doenças Tropicais - INCT-DT

Corresponding author:

Walderez Ornelas Dutra, PhD.

Laboratory of Cell-Cell Interactions, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Brazil. email: waldutra@gmail.com

Abstract

Although our immune system is constantly challenged by oral microbiota, it is usually capable of responding in a manner that allows for maintaining the balance between the control of potentially pathogenic bacteria and the development of a tissue-destructive response. Periodontal disease is the result of an exacerbated inflammatory response to bacteria antigens in which such immunological balance is lost. It is the main cause of dental loss in developed countries and it affects 10-15% of the world population. While treatment for periodontal disease is available, the disease is often recurrent. Thus, prevention is the most desirable strategy to avoid it. Although it has been shown that oral care is important in preventing periodontal disease, it is clear that it is not completely effective, suggesting that host's intrinsic factors are critical. Given the inflammatory nature of periodontal disease, strategies of inflammation control arise as good candidates for prevention. However, this control needs to take under consideration that some level of immune response is necessary to control the bacteria and reestablish homeostasis. In this review, we will discuss the immunoregulatory mechanisms involved in the progression and control of human periodontal disease, which may inspire new immune-based strategies for preventing periodontal disease.

Periodontal Disease: a complex host-pathogen interaction

The periodontium is a set of specialized structures that support and protect the tooth, consisting of hard tissues (cementum and alveolar bone) and soft tissue (gingiva and periodontal ligament). These tissues together assure the proper function of the teeth (Bartold and Narayanan, 2006) and, thus, alterations in any of these structures affect them. One common alteration that largely affects the world population is the inflammation of periodontal structures. The initial inflammation is called gingivitis and is induced by dental biofilm. It is characterized by the presence of clinical signs such as gingival redness and swelling, bleeding on probing, changes in contour and consistency, without loss of the periodontal attachment apparatus (ie. bone, cementum, and periodontal ligament) (AAP, 2000). Periodontitis is defined as a gingival inflammation extending into the adjacent attachment apparatus that affects the integrity of the tooth supporting tissues through of destruction of the cementum, periodontal ligament and bone (Armitage, 1999). Periodontitis can be chronic or aggressive; the latter is, unlike the first, mainly characterized by rapid attachment and bone loss, deposit of biofilm inconsistent with the severity of periodontal destruction, phagocytic abnormalities and hyper activation of macrophages (Armitage, 1999, Lang *et al*, 1999). Periodontitis is related to the immune response of the individual, and its progression is probably continuous, with short episodes of exacerbation and remission in localized sites (Armitage, 1999, Lang *et al*, 1999).

The prevalence of periodontal disease is somewhat variable across studies (Cortelli *et al*, 2002; Eke *et al*, 2012). However, it is estimated that 10-15% of the world population have periodontal disease (Papapanou *et al*, 1999). In a recent study, it was estimated that approximately 47% of individuals in the United States have some form of periodontitis (Eke *et al*, 2012). It is also consensus that periodontal disease is a major cause of tooth loss in adults and the elderly (Vos *et al*, 2010).

Among the various bacteria species that colonize the tooth, the main periodontal pathogens are: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Treponema denticola* (*T. denticola*) and *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) (AAP, 1996). However, bacterial complexes can provide a spectrum of relationships with the host that can vary from beneficial to harmful (Socransky and Haffajee, 2005). These harmful activities are dependent on various substances such as endotoxins and LPS (lipopolysaccharide) (Van Dyke and Serhan, 2003). Thus, the periodontal destruction is primarily induced by bacterial antigen that triggers a strong immune response through the release of chemical mediators of inflammation such as cytokines IL-1 β and TNF- α , myeloperoxidase and metalloproteinase by local cells. The inadequate resolution or failure to return to homeostasis results in the perpetuation of the inflammatory response with subsequent disease progression (Van Dyke, 2008). Thus, any mechanism that may assist in the maintenance or establishment of homeostasis is an ideal preventive of periodontal disease.

Immunoregulation in periodontal disease: loss of immunological balance and disease development

Shortly after the bacterial accumulation on the tooth surface, the inflammatory process develops leading to gingivitis, in which about 15% of the connective tissue underlying the epithelium is occupied by an inflammatory infiltrate composed primarily of neutrophils, macrophages and T cells (Page and Schroeder, 1976). In established periodontal disease, the inflammatory infiltrate is mainly composed of mononuclear cells, displaying B and T lymphocytes and plasma cells, as well as macrophages (Mosmann and Coffman, 1989). Cell-mediated immune responses have been extensively investigated in periodontal disease. The major players of the cellular response are antigen presenting cells, natural killer cells and the different subsets of T lymphocytes: CD4+, CD8+ and double negative (CD4-CD8-) T cells (Thomson *et al*, 2006). Although all these cell types can secrete cytokines, CD4+ T cells are recognized as the major orchestrators of the cellular response due to their distinguished ability to produce cytokines. CD4+ T cells can be divided into functionally different subsets based on their cytokine profile (Mosmann and Coffman, 1989). These subsets are, currently, Th1, Th2, Th3, Th17 and Treg (Serrano, 2009). Th1 cells mediate the response against intracellular pathogens and synthesize mainly IFN-gamma and IL-2, playing an important role in the activation of macrophages. Th2 cells mediate the response against extracellular parasites, produce mainly IL-4, IL-5 and IL-13, and are critical in the establishment of humoral immune response. In humans, both Th2

and Th1 cells release IL-10, a cytokine that mediates a self-regulating response in these cells. Th17 lymphocytes are related to the immune response against pathogenic extracellular bacteria and fungi, as well as autoimmune diseases, synthesizing mainly IL-17. Treg cells act by regulating the immune response via the synthesis of TGF- β and IL-10. Th3 cells are lymphocytes that secrete TGF- β , playing a special role in oral tolerance (Mosmann and Coffman, 1989; Fukaura *et al*, 1995; Harrington *et al*, 2005; Serrano, 2006).

Some studies in humans and in animal models have suggested a concomitant occurrence of Th1 and Th2 response in periodontal disease (Petit *et al*, 2001; Berglundh *et al*, 2002). While Th1 response would act in maintaining the inflammation, Th2 cytokines would be important in inducing a response by B cells (Yamamoto *et al*, 1997). In a study evaluating biopsies from patients with aggressive periodontitis, it was shown that the frequencies of CD3+ cells were significantly lower compared to healthy individuals (33% *versus* 61.1%, respectively). The presence of CD4+ cells was also low as compared to patients without periodontitis (8.5% *versus* 29.2% in healthy patients (Suárez *et al*, 2004). Other authors have shown that LPS from *P. gingivalis* induced a greater release of IL-1 β , PGE2 and IL-10 by antigen-presenting cells in human gingival tissues with chronic periodontitis (Pulendran *et al*, 2001). Thus, there appears that periodontopathic bacteria contribute for the host's inability to sustain an immune response mediated by Th1 cells in periodontitis, which may facilitate the progression of the disease (Gemmell *et al*, 2007). Recently, a study showed

elevated levels of mRNA for IL-17, a cytokine synthesized by Th17 lymphocytes, in gingival tissues with chronic periodontitis, in humans (Cardoso *et al*, 2009). The presence of Treg cells has been shown in lesions derived from chronic periodontitis patients, suggesting a role for these cells in modulating the local immune response through the expression of IL-10 as well as TGF-beta (Cardoso *et al*, 2009). The expression of mRNA of IL-5 and IL-6, but not IL-2 and IL-4, was detected in gingival cells from patients with CP by RT-PCR (Fujihashi *et al*, 1996). However, analysis of IL-4 expression by CD4+CD45RO+ cells showed a higher frequency in lesions from CP patients as compared to healthy individuals (Yamazaki *et al*, 1994). Yamazaki *et al*. (1996) showed that the level of IFN- γ was higher in circulating cells than gingival cells in periodontitis patients, while the expression of mRNA for IL-12 and IL-13 did not change when comparing blood and lesions. However, the expression of IL-10 was higher in the gingival cells than blood. Lima *et al*. (2011) demonstrated that although mononuclear cells from chronic and aggressive periodontitis patients display a mixed inflammatory and anti-inflammatory cytokine profile, the cellular sources of these cytokines are different in patients with distinct clinical forms. Thus, a clear dichotomy towards a particular CD4 T cell subpopulation is not observed in periodontal disease, suggesting the concomitant occurrence of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in periodontal lesions, gingival crevice flow, gingival cells and circulating cells from periodontitis patients. Given that periodontal disease is associated with a

complex immune response, it appears that a disruption of balance in the immune response may contribute to the onset and progression of periodontal damage.

Periodontal bacteria play a key role in the immune response during the development of periodontal disease. *P. gingivalis*, a microorganism known to be associated with advanced periodontitis, has been involved in several pathways which may lead to periodontal disease. LPS of *P. gingivalis* induces an immune response with characteristics of Th2 cells, with high IL-13 synthesis, IL-5 and IL-10, but relatively low levels of IFN-gamma (Mahanonda and Pichyangkul, 2007). In addition, its bacterium fimbriae inhibit the synthesis of IL-12p70 by antigen-presenting cells (Hajishengallis *et al*, 2007). LPS from *Aa*, another microorganism associated with aggressive periodontitis, can induce an altered response in macrophages by tempering with cytokine secretion (Tanabe *et al*, 2008). Moreover, recent study has shown that *Aa* induces the expression of the NLRP3 inflammasome, important for the production of inflammatory cytokines (Belibasakis and Johansson, 2012). Peptidoglycan isolated from *T. denticola* induces the release of cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α in U937 cells (leukemic mononuclear cells) (Tanabe *et al*, 2008). Thus, there seems to be evidence that periodontopathogenic microorganisms play a fundamental role in establishing the profile of the immune response in periodontal disease and their components are able to orchestrate, to some extent, the expression of cytokines, which, in turn, participate in disease control or progression.

Given the fact that active immunoregulation and tissue destruction are important aspects in periodontal disease, an association between this condition and autoimmunity has been proposed. Reports have demonstrated the presence of elevated levels of antibody to collagen in sera, or of anti-collagen antibody-producing cells in tissue, of patients with periodontal disease (Ftis *et al*, 1986; Peng, 1988). Moreover, antibodies to self-antigens, such as collagen type I, host DNA, laminin, fibronectin, and desmosin have been shown in both chronic and aggressive periodontitis (Anusaksathien *et al*, 1992 a,b; Govze and Herzberg, 1993; De-Gennaro *et al*, 2006; Koutouzis *et al*, 2009). Sera from patients with aggressive periodontitis showed high levels of antibodies against collagen type I and collagen type III, in both native form, as well as post-translationally modified forms, as compared to patients with gingivitis or chronic periodontitis (Hendler *et al*, 2010). Autoimmune conditions such as rheumatoid arthritis are characterized by an immune-mediated bone destruction. In experimental arthritis, alveolar bone loss was exacerbated when animals were concomitantly infected with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, suggesting a close interaction between these two conditions (Queiroz-Junior *et al*, 2012). Moreover, IL-17 has been shown to be correlated with bone destruction in periodontal disease as well as in autoimmune arthritis in humans (Moutsopoulos *et al*, 2012; Pöllinger *et al*, 2011). Thus, although periodontal disease and autoimmune diseases display distinct etiology, they share some immunoregulatory aspects, which are associated with the pathologic expression in both diseases, which is bone loss. It is tempting to

hypothesize that alternative immune-based therapies for treatment for periodontal disease may also ameliorate autoimmunity. However, further studies need to be developed to test this possibility.

Another interesting aspect is the participation of fibroblasts in the establishment of the cytokine microenvironment in periodontal disease. These cells, classically involved in collagen and extracellular matrix synthesis, are also capable of secreting cytokines and indeed do so, displaying an immunological activity as well (Graves, 2008). Recent studies have shown that these cells not only produce but also are activated by inflammatory cytokines such as IL-6 and IL-1 (Sawada *et al*, 2013). Thus, understanding the role of fibroblasts in influencing the immune response, and also how these cells participate in the interplay with other local cells and their products, will be critical for the control of periodontal disease.

In addition to the influence of the periodontopathic bacteria and their products, cytokine expression is also influenced by host genetic characteristics such as gene polymorphisms and DNA methylation. These important subjects have been reviewed by us, discussing the association of different gene polymorphisms and methylation patterns with the different forms of periodontal disease (Dutra *et al*, 2009; Gomez *et al*, 2009). The identification of gene polymorphisms that can serve as susceptibility markers to periodontal disease is of particular interest, as it may provide means of identifying susceptible groups and, thus, allow for the introduction of early care and preventive measures. Moreover,

polymorphisms in cytokine genes may help identify cytokines that are important for immunoregulation, providing insights towards the identification of new targets for immunomodulatory interventions.

Figure 1 shows a model for the interaction between cells, bacterial products and cytokines and the establishment of periodontal disease.

Immunomodulatory interventions as preventive measures of periodontal disease

One of the challenges to propose immune-based interventions to prevent periodontal disease is the fact that interventions that inhibit certain cytokines may pose a threat to oral health in general. For example: it is a consensus that periodontitis is the consequence of an inflammatory reaction and, thus, the inhibition of inflammatory cytokines seem, at first, to be a good strategy (Cekici *et al*, 2014).

In fact, targeting inflammation as a strategy to control periodontitis has been proposed by other authors (Nyman *et al*, 1979; Offenbacher *et al*, 1987; Williams *et al*, 1987; Jeffcoat *et al*, 1988; Jeffcoat *et al*, 1991; Howell *et al*, 1991; Hasturk *et al*, 2007; Van Dyke, 2007; Cekici *et al*, 2014). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs targeting cyclo-oxygenase 1- and cyclooxygenase 2-dependent pathways, inhibit the generation of prostanoids and inflammatory mediators. Several classes of nonsteroidal anti-inflammatory drugs have been used in animal models and humans to control inflammatory destruction in periodontal diseases (Howell, 1993). Dogs with ligature-induced experimental periodontitis that were treated daily with

Indomethacin showed delay in the onset of disease and decrease in alveolar bone loss, as evaluated by histological and radiographic methods (Nyman, *et al*, 1979). Flurbiprofen, a derivative of propionic acid, showed a statistically significant inhibition of attachment loss, gingival inflammation, and bleeding on probing in non-human primates with natural and ligature-induced periodontal disease (Offenbacher *et al*, 1987). Similar results using flurbiprofen were observed in dogs with experimental periodontal disease (Williams *et al*, 1987). In human, flurbiprofen significantly decreased the rate of bone loss as compared to placebo group (Jeffcoat *et al*, 1988). Treatment in patients with periodontitis for 3 months with naproxen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug more potent than flurbiprofen, decreased significantly bone loss as determined by standardized digital radiography, when compared with placebo (Jeffcoat *et al*, 1991). Another nonsteroidal anti-inflammatory drug, piroxican, was utilized locally in experimental gingivitis in dogs. The gingival index, bleeding sites, and biofilm formation were significantly lower than in the group treated that placebo (Howell *et al*, 1991). Recently, it has been showed that products of omega-3 (i.e resolvins) have similar biologic activity to lipoxins, natural proresolvin inflammatory molecules. Resolvins stimulate the resolution of inflammation through multiple mechanisms, including preventing neutrophils recruitment, fagocytosis of apoptotic neutrophils and tissue clearance (Hasturk *et al*, 2007; Van Dyke, 2007). These papers suggested that the control of inflammation has been focusing on the use of pharmacologic agents that inhibit proinflammatory mediator pathways. However, by inhibiting inflammatory

cytokines such as TNF-alpha, IFN-gamma, IL-1 and IL-6, important functions related to bacteria control such as phagocytosis and cytolytic functions, can be decreased (Flynn, 2004). As a consequence, the growth of periodontopathic bacteria would alter the oral flora, leading to other local and systemic health issues. Similarly, the use of other anti-inflammatory drugs could help but would have to be used only temporarily. Thus, its discontinuation could lead to an even more exacerbated inflammation in response to changes in the flora. As mentioned, the desirable interference to prevent periodontal disease would have to be a molecule that has immunological effects of controlling inflammation but, at the same time, keeping potentially pathogenic bacteria in check. We will discuss the use of N-acetyl cystein, a molecule that modulates intracellular GSH levels and influences several cellular functions, as a possible candidate for such intervention.

Glutathione (GSH) is a tripeptide thiol found free in the cytosol of all animal cells. It consists of 3 essential amino acids: glutamic acid, glycine and cysteine. Glutathione plays a key role in important cellular functions, mainly the protection against the toxic effects of reactive oxygen species (ROS) and modulation of immune response. Low levels of GSH have been associated to chronic diseases and AIDS (Dröge and Breitkreutz, 2000; Rahman and MacNee, 2000; Bilzer and Lauterburg, 1991).

A decrease in the activation of human neutrophils was observed using an enzyme that inhibits the synthesis of GSH (BSO-buthionine sulfoximine), leading to a rapid depletion of GSH in the cells (Bilzer and Lauterburg, 1991). Similarly, BSO

depleted GSH in lymphocytes, leading to a partial activation of these cells. Blastic transformation was observed after full restoration of GSH levels. Moreover, the presence of either non-detectable levels as well as high levels of intracellular GSH may affect the proliferation of CD4+ and CD8+ (Kinscherf *et al*, 1991).

N-acetyl-cysteine (NAC) is a variant of acetylated cysteine that is converted to cysteine, a metabolite critical for GSH synthesis. NAC acts in several host systems. NAC suppresses the cytokine-stimulated expression of VCAM-1, inhibiting leukocyte adhesion (Marui *et al*, 1993). Activation of NF- κ B in response to a variety of signals (IL-1, TNF, H₂O₂) can also be inhibited by NAC, regulating cytokine production. Moreover, NAC inhibits RANKL, preventing osteoclastic differentiation and bone resorption (Zafarullah *et al*, 2003; Amore *et al*, 2013). Figure 2 shows some possible mechanisms of action for NAC, with regards to immunoregulation and pathology in periodontal disease. The proliferative response and activity of lymphocytes, as well as activation of macrophages, are strongly influenced by small changes in extracellular concentrations of cysteine (Dröge *et al*, 1991; Rocha-Vieira *et al*, 2003; Kato *et al*, 2008). Therefore, therapeutic strategies aimed at increasing intracellular levels of GSH using NAC in the prevention and treatment of chronic diseases has been proposed. A summary of the diseases and models using NAC as a treatment or preventive measure is shown in table 1. NAC has been used in several human diseases (listed in table 1) and the results show a promising role for this molecule in disease control/treatment. As examples, protective effects of NAC have been described in experimental and clinical

respiratory disorders. Oral NAC has been employed as a mucolytic agent for use in chronic bronchitis, and its use showed a decrease in the deterioration in chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis in patients (Stiksa *et al*, 1992; Demedts *et al*, 2005). In chronic diseases such as HIV, NAC improved CD4 ratio and NK cell activity (Herzenberg *et al*, 1997; Breitzkreutz *et al*, 2000). In experimental models of parasitic diseases, it has been shown that NAC partially restored CD4/CD8 ratios in *Trypanosoma cruzi* infection (Guevara *et al*, 2000), and delayed lesion development in *Leishmania major* infection (Rocha-Vieira *et al*, 2003). In other conditions associated with periodontal disease pathology, NAC regulated the immune response induced by LPS and suppressed LPS-induced cytokines IL1- β , IL-6, IL-8 and TNF- α in human gingival fibroblasts (Kim *et al*, 2007). With regards to bone metabolism, NAC accelerated the bone regeneration (Yamada *et al*, 2013), improved bone regeneration using inorganic biomaterials (Yamada *et al*, 2010), and decreased alveolar bone loss in a model of periodontal inflammation (Toker *et al*, 2009).

Evaluation of the effects of GSH depletion in mice has demonstrated that depletion inhibited the production of Th1-associated cytokines leading the response to Th2-associated cytokines. However, after restoring the GSH level with NAC there was a return to the pattern of Th1 response (Peterson *et al*, 1998).

The role of NAC in modulating the immune response in parasitic diseases has been studied by our group. Assessing the immune response of susceptible mice infected with *Leishmania major*, ingesting daily doses of NAC before being

infected, there was a high frequency of cells producing IFN-gamma and TNF- α in mice treated with NAC. Thus, there seems to be a better immune response in the animals, probably associated with more efficient macrophage activation. However, a complete profile change from Th2 to Th1 response was not observed. Interestingly, these animals had a delay in lesion development, suggesting a protective role of the NAC in this model (Rocha-Vieira *et al*, 2003).

In models associated with periodontal disease the role of NAC has also been studied. One study evaluated the expression of IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α and MMP-2 induced by LPS of *Aa* and *P. gingivalis* in the absence or presence of NAC-treated gingival fibroblasts in culture (FG). The results showed that FG had significantly increased levels of ROS in the presence of LPS *Aa* and *P. gingivalis*. NAC suppressed spontaneous and LPS-mediated ROS expression. Furthermore, NAC decreased the expression of mRNA for pro-inflammatory cytokines. Moreover, NAC significantly decreased synthesis and activation of MMP-2 in the presence and absence of LPS (Kim do *et al*, 2007). In diabetic rats systemically treated with NAC, the bone loss in experimental periodontitis was significantly decreased (Toker *et al*, 2009). In repeated infections with *P. gingivalis* in the peritoneal cavity of mice, there was not an increase in the levels of GSH, which was associated with a Th2-dominant condition, retarding the elimination of *P. gingivalis*. On the other hand, the increase in GSH levels was associated with an increase in bacterial elimination (Kato *et al*, 2008). Reduced GSH is able to promote the reduction of intracellular ROS. For this, reduced GSH is oxidized

binding to other GSH molecule, and releasing water. This dimeric form of GSH, GSSG (oxidized GSH), can be reduced back to GSH by the enzyme GSH reductase via NADPH. Increased levels of GSSG are correlated with oxidative stress (Meister, 1994). Altered levels of GSSG can be observed in the gingival crevicular fluid in chronic periodontitis (Borges *et al*, 2007).

The mechanism by which NAC may interfere with GSH levels in periodontitis is not clear. However, the benefits of NAC use and GSH modulation is increasingly shown to be effective against bone loss and, thus protection to periodontitis. Amongst the advantages of NAC are the facts that it is approved for human use, does not present side effects and has shown to have effects in modulating the immune response and controlling oxidative stress. Thus, the use of this and other immunomodulators merit further studies to prevent periodontal disease.

Conclusions:

The pathogenesis of periodontal diseases is complex. Changes in the immune response have been associated with the onset and development of periodontal disease. The immune response is an important factor in the control of subgingival biofilm, bacterial sub-products, and healing process. However, in some situations individual immune response is unregulated, resulting in altered level of cytokines, high level of the proteases and decoy to osteoclast differentiation, leading to a progressive and cumulative tissue damage and destruction of periodontal apparatus.

The ideal prophylactic will be one that combines the induction of an effective immune response but without massive periodontal destruction, controlling periodontal bacteria and antigens and promoting a return to homeostasis. From this point of view, therapeutic strategies aiming to aid to an effective and controlled immune response is, currently, something to be achieved on periodontal therapeutics. GSH may be one these key molecules that can change the profile of the immune response in periodontitis. Since periodontal diseases are chronic process, therapeutic strategies using NAC systemically but also locally to increase GSH in periodontal tissues is a possible alternative that would benefit millions of people already affected or at risk of developing periodontal disease.

Acknowledgements: We would like to acknowledge all authors whose contributions drove the rational discussed in this article, as well as so many others whose important work we did not cite, given the focus of this paper and space limitations. LSD, KJG and WOD are CNPq fellows; KJG and WOD are members of INCT-DT.

References:

- AAP (1996). Consensus report in prevention. *Annals Periodontol* 1: 250-255.
- AAP (2000). Parameter on chronic periodontitis with slight to moderate loss of periodontal support. *J Periodontol* 71: 853-855.

- Amore A, Formica M, Giacchino F, Gigliola G, Bonello F, Conti G, Camilla R, Coppo R (2013). N-Acetylcysteine in hemodialysis diabetic patients resets the activation of NF-kB in lymphomonocytes to normal values. *J Nephrol* 26(4):778-786.
- Anusaksathien O, Singh G, Matthews N, Dolby AE (1992a). Autoimmunity to collagen in adult periodontal disease: immunoglobulin classes in sera and tissue. *J Periodontal Res* 27(1): 55-61.
- Anusaksathien O, Singh G, Peters TJ, Dolby AE (1992b). Immunity to self-antigens in periodontal disease. *J Periodontol* 63(3):194-199.
- Armitage GC (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals Periodontol* 4: 1-6.
- Bartold PM, Narayanan AS (2006). Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol* 2000 40: 29-49.
- Belibasakis GN, Johansson A (2012). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* targets NLRP3 and NLRP6 inflammasome expression in human mononuclear leukocytes. *Cytokine* 59:124-30.
- Beloosesky R, Ginsberg Y, Khatib N, Maravi N, Ross MG, Itskovitz-Eldor J, Weiner Z (2013). Prophylactic maternal N-acetylcysteine in rats prevents maternal inflammation-induced offspring cerebral injury shown on magnetic resonance imaging. *Am J Obstet Gynecol* 208(3):213.e1-6.
- Berglundh T, Liljenberg B, Lindhe J (2002). Some cytokine profiles of T-helper cells in lesions of advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* 29: 705-709.

- Bilzer M, Lauterburg BH (1991). Glutathione metabolism in activated human neutrophils: stimulation of glutathione synthesis and consumption of glutathione by reactive oxygen species. *Eur J Clin Invest* 2: 316-322.
- Bogdani M, Henschel AM, Kansra S, Fuller JM, Geoffrey R, Jia S, Kaldunski ML, Pavletich S, Prosser S, Chen YG, Lernmark A, Hessner MJ (2013). Biobreeding rat islets exhibit reduced antioxidative defense and N-acetyl cysteine treatment delays type1 diabetes. *J Endocrinol* 216(2):111-23.
- Borges I Jr, Moreira EA, Filho DW, de Oliveira TB, da Silva MB, Fröde TS (2007). Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. *Mediators Inflamm* 2007:45794.
- Breitzkreutz R, Pittack N, Nebe CT, Schuster D, Brust J, Beichert M, Hack V, Daniel V, Edler L, Dröge W (2000) . Improvement of immune functions in HIV infection by sulfur supplementation: two randomized trials. *J Mol Med* 78(1):55-62.
- Cardoso CR, Garlet GP, Crippa GE, Rosa AL, Júnior WM, Rossi MA, Silva JS (2009). Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 24: 1-6.
- Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE (2014). Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000 64(1):57-80.
- Cortelli JR, Cortelli SC, Pallos D, Jorge AO (2002). Prevalence of aggressive periodontitis in adolescents and young adults from Vale do Paraíba. *Pesqui Odontol Bras* 16: 163-168.

- Dauletbaev N, Fischer P, Aulbach B, Gross J, Kusche W, Thyroff-Friesinger U, Wagner TO, Bargon J (2009). A phase II study on safety and efficacy of high-dose N-acetylcysteine in patients with cystic fibrosis. *Eur J Med Res* 14(8):352-8.
- De Flora S, Grassi C, Carati L (1997). Attenuation of influenza-like symptomatology and improvement of cell-mediated immunity with long-term N-acetylcysteine treatment. *Eur Respir J* 10(7):1535-41.
- De-Gennaro LA, Lopes JD, Mariano M (2006). Autoantibodies directed to extracellular matrix components in patients with different clinical forms of periodontitis. *J Periodontol* 77(12): 2025-2030.
- Demedts M, Behr J, Buhl R, Costabel U, Dekhuijzen R, Jansen HM, MacNee W, Thomeer M, Wallaert B, Laurent F, Nicholson AG, Verbeken EK, Verschakelen J, Flower CD, Capron F, Petruzzelli S, De Vuyst P, van den Bosch JM, Rodriguez-Becerra E, Corvasce G, Lankhorst I, Sardina M, Montanari M; FIGENIA Study Group (2005). High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 24;353(21):2229-42.
- Dröge W, Breitschneider R (2000). Glutathione and immune function. *Proc Nutr Soc* 59: 595-600.
- Dröge W, Eck HP, Gmünder H, Mihm S (1991). Modulation of lymphocyte functions and immune responses by cysteine and cysteine derivatives. *Am J Med* 91: 140s-144s.
- Dutra WO, Moreira PR, Souza PE, Gollob KJ, Gomez RS (2009). Implications of cytokine gene polymorphisms on the orchestration of the immune

response: lessons learned from oral diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 20: 223-32.

- Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ (2012). Periodontal Disease Surveillance workgroup: James Beck (University of North Carolina, Chapel Hill, USA), Gordon Douglass (Past President, American Academy of Periodontology), Roy Page (University of Washin). Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res* 91: 914-920.
- Flynn JL (2004). Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis (Edinb)* 84: 93-101.
- Ftis A, Singh G, Dolby AE (1986). Antibody to collagen type I in periodontal disease. *J Periodontol* 57: 693-698.
- Fujihashi K, Yamamoto M, Hiroi T, Bamberg TV, McGhee JR, Kiyono H (1996). Selected Th1 and Th2 cytokine mRNA expression by CD4(+) T cells isolated from inflamed human gingival tissues. *Clin Exp Immunol* 103: 422-8.
- Fukaura H, Kent SC, Pietrusewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL, Hafler DA (1996). Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor- β 1-secreting Th3 cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 98: 70-77.
- Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ (2007). The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. *Periodontology* 2000 43: 14-40.

- Geudens N, Wuyts WA, Rega FR, Vanaudenaerde BM, Neyrinck AP, Verleden GM, Lerut TE, Van Raemdonck DE (2008). N-acetyl cysteine attenuates the inflammatory response in warm ischemic pig lungs. *J Surg Res* 146(2):177-83.
- Gomez RS, Dutra WO, Moreira PR (2009). Epigenetics and periodontal disease: future perspectives. *Inflamm Res* 58: 625-9.
- Govze Y, Herzberg MC (1993). Serum and gingival crevicular fluid antidesmosomal antibodies in periodontitis. *J Periodontol* 64(7): 603-608.
- Graves D (2008). Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 79(8 Suppl):1585-91.
- Guevara AG, Guilvard E, Borges MM, Cordeiro da Silva A, Ouaisi A (2000). N-Acetylcysteine and glutathione modulate the behaviour of *Trypanosoma cruzi* experimental infection. *Immunol Lett* 71(2):79-83.
- Hajishengallis G, Shakhathreh MA, Wang M, Liang S (2007). Complement receptor 3 blockade promotes IL-12-mediated clearance of *Porphyromonas gingivalis* and negates its virulence in vivo. *J Immunol* 179: 2359-2367.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunology* 6: 1123-1132.
- Hasturk H, Kantarci A, Goguet-Surmenian E, Blackwood A, Andry C, Serhan CN, Van Dyke TE (2007). Resolvin E1 regulates inflammation at the cellular and

tissue level and restores tissue homeostasis in vivo. *J Immunol* 179(10):7021–7029.

- Hendler A, Mulli TK, Hughes FJ, Perrett D, Bombardieri M, Hourri-Haddad Y, Weiss EI, Nissim A (2010). Involvement of autoimmunity in the pathogenesis of aggressive periodontitis. *J Dent Res* 89(12):1389-1394.
- Herzenberg LA, De Rosa SC, Dubs JG, Roederer M, Anderson MT, Ela SW, Deresinski SC, Herzenberg LA (1997). Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(5):1967-1972.
- Howell TH (1993). Blocking periodontal disease progression with anti-inflammatory agents. *J Periodontol* 64(8 Suppl):828-833.
- Howell TH, Jeffcoat MK, Goldhaber P, et al (1991). Inhibition of alveolar bone loss in beagles with the NSAID naproxen. *J Periodont Res* 26(6):498-501.
- Jeffcoat MK, Page R, Reddy M, et al (1991). Use of digital radiography to demonstrate the potential of naproxen as an adjunct in the treatment of rapidly progressive periodontitis. *J Periodont Res* 26(5):415-421.
- Jeffcoat MK, Williams RC, Reddy MS, English R, Goldhaber P (1988). Flurbiprofen treatment of human Periodontitis: Effect of alveolar bone height and metabolism. *J Periodont Res* 23(6):381-385.
- Jeremias A, Soodini G, Gelfand E, Xu Y, Stanton RC, Horton ES, Cohen DJ (2009). Effects of N-acetyl-cysteine on endothelial function and inflammation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Heart Int* 4(1):e7.

- Kato C, Mikami M, Natsuno T (2008). Participation of glutathione in the elimination of *Porphyromonas gingivalis* in vivo. *Oral Microbiol Immunol* 23: 441-448.
- Kim do Y, Jun JH, Lee HL, Woo KM, Ryoo HM, Kim GS, Baek JH, Han SB (2007). N-acetylcysteine prevents LPS-induced pro-inflammatory cytokines and MMP2 production in gingival fibroblasts. *Arch Pharm Res* 30: 1283-1292.
- Kinscherf R, Fischbach T, Mihm S, Roth S, Hohenhaus-Sievert E, Weiss C, Edler L, Bärtsch P, Dröge W (1991). Effect of glutathione depletion and oral N-acetyl-cysteine treatment on CD4+ and CD8+ cells. *FASEB J* 8: 448-451.
- Koutouzis T, Haber D, Shaddox L, Aukhil I, Wallet SM (2009). Autoreactivity of serum immunoglobulin to periodontal tissue components: a pilot study. *J Periodontol* 80(4): 625-633.
- Lang N, Bartold PM, Cullinan M, Jeffcoat M, Mombelli A, Murakami S, Page R, Papapanou P, Tonetti M, Van Dyke T (1999). Consensus report: Aggressive periodontitis. *Ann Periodontol* 4: 53.
- Lima PM, Souza PE, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO (2011). Aggressive and chronic periodontitis correlate with distinct cellular sources of key immunoregulatory cytokines. *J Periodontol* 82: 86-95.
- Mahanonda R, Pichyangkul S (2007). Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontol* 2000 43: 41-55.

- Marthandan S, Hyland P, Pawelec G, Barnett Y (2013). An investigation of the effects of the antioxidants, ebselen or N-acetyl cysteine on human peripheral blood mononuclear cells and T cells. *Immun Ageing* 10(1):7.
- Marui N., Offermann M. K., Swerlick R., Kunsch C., Rosen C. A., Ahmad M. et al. (1993) Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest* 92: 1866–1874.
- Meister A (1994). Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res* 54: 1969-1975.
- Mosmann TR, Coffman RL (1989). Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7: 145-173.
- Moutsopoulos NM, Kling HM, Angelov N, Jin W, Palmer RJ, Nares S, Osorio M, Wahl SM (2012). *Porphyromonas gingivalis* promotes Th17 inducing pathways in chronic periodontitis. *J Autoimmun* 39(4):294-303.
- Nandate K, Ogata M, Tamura H, Kawasaki T, Sata T, Shigematsu A (2005). N-acetyl-cysteine attenuates endotoxin-induced adhesion molecule expression in human whole blood. *Anesth Analg* 100(5):1453-1457.
- Nyman S, Schroeder HE, Lindhe J (1979). Suppression of inflammation and bone resorption by indomethacin during experimental Periodontitis in dogs. *J Periodontol* 50(9):450-461.

- Oddera S, Silvestri M, Sacco O, Eftimiadi C, Rossi GA (1994). N-acetylcysteine enhances in vitro the intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by human alveolar macrophages and blood polymorphonuclear leukocytes and partially protects phagocytes from self-killing. *J Lab Clin Med* 124(2):293-301.
- Offenbacher S, Braswell LD, Loos AS, et al (1987). The effects of flurbiprofen on the progression of Periodontitis in *Macaca mulatta*. *J Periodont Res* 22(6):473-481.
- Page RC, Schroeder HE (1976). Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* 34: 235–249.
- Paintlia MK, Paintlia AS, Singh AK, Singh I (2008). Attenuation of lipopolysaccharide-induced inflammatory response and phospholipids metabolism at the feto-maternal interface by N-acetyl cysteine. *Pediatr Res* 64(4):334-9.
- Pal A, Alam S, Singhal J, Kumar R, Ansari KM, Das M (2013). Protective effect of topical application of α -tocopherol and/or N-acetyl cysteine on argemone oil/alkaloid-induced skin tumorigenesis in mice. *Nutr Cancer* 65 (Suppl1):78-87.
- Papapanou PN, Engebretson SP, Lamster IB (1999). Current and future approaches for diagnosis of periodontal diseases. *N Y State Dent J*. 65: 32-37.
- Peng TK (1988). Serum antibodies to native and denatured type I and III collagen in patients with periodontal disease. *Proc Natl Sci Counc Repub China* 12(1):21-26.

- Peristeris P, Clark BD, Gatti S, Faggioni R, Mantovani A, Mengozzi M, Orencole SF, Sironi M, Ghezzi P (1992). N-acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production. *Cell Immunol* 140(2):390-9.
- Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh C (1998). Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Immunology* 95: 3071-3076.
- Petit MD, Hovenkamp E, Hamann D, Roos MT, van der Velden U, Miedema F, Loos BG (2001). Phenotypical and functional analysis of T cells in periodontitis. *J Periodontal Res* 36: 214-220.
- Pöllinger B, Junt T, Metzler B, et al (2011). Th17 cells, not IL-17+ $\gamma\delta$ T cells, drive arthritic bone destruction in mice and humans. *J Immunol* 186(4): 2602-2612.
- Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzadeh M, Van Dyke T, Banchereau J (2001). Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol* 167: 5067-5076.
- Queiroz-Junior CM, Madeira MF, Coelho FM, et al (2012). Experimental arthritis exacerbates *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced periodontitis in mice. *J Clin Periodontol* 39(7):608-616.
- Rahman I, MacNee W (2000). Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J* 16: 534-554.
- Ramudo L, Manso MA, Vicente S, De Dios I (2005). Pro- and anti-inflammatory response of acinar cells during acute pancreatitis. Effect of N-acetyl cysteine. *Cytokine* 32(3-4):125-31.

- Rocha–Vieira E, Ferreira E, Vianna P, De Faria DR, Gaze ST, Dutra WO, Gollob KJ (2003). Histopathological outcome of *Leishmania major*-infected BALB/c mice is improved by oral treatment with N-acetyl-L-cysteine. *Immunology* 108: 401-408.
- Sawada S, Chosa N, Ishisaki A, Naruishi K (2013). Enhancement of gingival inflammation induced by synergism of IL-1 β and IL-6. *Biomed Res* 34: 31-40.
- Serrano Hernández A (2009). Helper (TH1, TH2, TH17) and regulatory cells (Treg, TH3, NKT) in rheumatoid arthritis. *Reumatol Clin* 5 Suppl 1: 1-5.
- Socransky SS, Haffajee AD (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 38: 135-87.
- Stiksa G, Nemcek K, Melin S (1984). Effects of inhaled N-acetylcysteine in combination with terbutaline. *Eur J Respir Dis* 65(4):278-82.
- Suárez LJ, Ocampo AM, Dueñas RE, Rodríguez A (2004). Relative proportions of T-cell subpopulations and cytokines that mediate and regulate the adaptive immune response in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontol* 75: 1209-1215.
- Sunitha K, Suresh P, Santhosh MS, et al (2013). Inhibition of hyaluronidase by N-acetyl cysteine and glutathione: role of thiol group in hyaluronan protection. *Int J Biol Macromol* 55:39-46
- Tanabe SI, Bodet C, Grenier D (2008). *Treponema denticola* peptidoglycan induces the production of inflammatory mediators and matrix metalloproteinase 9 in macrophage like cells. *J Periodontal Res* 44: 503–510.

- Tanabe SI, Grenier D (2008). Macrophage tolerance response to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide induces differential regulation of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and matrix metalloproteinase 9 secretion. *J Periodontol* 43: 372-377.
- Thakurta IG, Chattopadhyay M, Ghosh A, Chakrabarti S (2012). Dietary supplementation with N-acetyl cysteine, α -tocopherol and α -lipoic acid reduces the extent of oxidative stress and proinflammatory state in aged rat brain. *Biogerontology* 13(5):479-88.
- Thomson CW, Lee BP, Zhang L (2006). Double-negative regulatory T cells: non-conventional regulators. *Immunol Res* 35: 163-78.
- Toker H, Ozdemir H, Eren K, Ozer H, Sahin G (2009). N-acetylcysteine, a thiol antioxidant, decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J. Periodontol* 80: 672-678.
- Ueno T, Yamada M, Igarashi Y, Ogawa T (2011). N-acetyl cysteine protects osteoblastic function from oxidative stress. *J Biomed Mater Res A* 99(4): 523-31.
- Van Dyke TE (2007). Control of inflammation and periodontitis. *Periodontol* 2000 45: 158–166.
- Van Dyke TE (2008). The management of inflammation in periodontal disease. *J Periodontol* 79: 1601-1608.
- Van Dyke TE, Serhan CN (2003). Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res* 82: 82-90.

- Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, et al (2012). Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380: 2163-2196.
- Williams RC, Jeffcoat MK, Howell TH, et al (1987). Indomethacin or flurbiprofen treatment of Periodontitis in beagles: Comparison of effect on bone loss. *J Periodont Res* 22(5):403-407.
- Yamada M, Tsukimura N, Ikeda T, et al (2013) N-acetyl cysteine as an osteogenesis-enhancing molecule for bone regeneration. *Biomaterials* 34(26):6147-6156.
- Yamada M, Ueno T, Minamikawa H, Sato N, Iwasa F, Hori N, Ogawa T (2010). N-acetylcysteine alleviates cytotoxicity of bone substitute. *J Dent Res* 89(4):411-416.
- Yamamoto M, Fujihashi K, Hiroi T, McGhee JR, Van Dyke TE, Kiyono H (1997). Molecular and cellular mechanisms for periodontal diseases: role of Th1 and Th2 type cytokines in induction of mucosal inflammation. *J Periodontal Res* 32: 115-119.
- Yamazaki K, Nakajima T, Gemmell E, Kjeldsen M, Seymour GJ, Hara K (1996). Biased expression of T cell receptor V beta genes in periodontitis patients. *Clin Exp Immunol* 106(2): 329-35.
- Yamazaki K, Nakajima T, Gemmell E, Polak B, Seymour GJ, Hara K (1994). IL-4- and IL-6-producing cells in human periodontal disease tissue. *J Oral Pathol Med* 23: 347-353.

- Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 60(1):6-20. *Cell Mol Life Sci* **60**(1):6-20.

Legends:

Figure 1 - Proinflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-17 produced by different cell types can induce a breakdown in the balance of RANKL by activating osteoclasts and promoting bone resorption. Cytokines such as IFN- γ , IL-10 and IL-4 are capable of controlling directly or indirectly the production of RANKL by decreasing osteoclast activation. Also, changes in the balance of inflammatory cytokines and PGE-2 are capable of inducing the destruction of extracellular matrix by MMPs and MPO. TIMPs and TGF-beta can control the destruction of the extracellular matrix. Thus, factors that modulate the expression of these cytokines and effector molecules may be beneficial for the development of periodontal disease.

Figure 2 – Possible mechanisms of action for NAC in immune regulation and pathology in periodontal disease. Cytokines (i.e. TNF- α and IL-1 β) and ROS are increased during the development of periodontal disease and act by stimulating NF- κ B nuclear translocation, which is critical for the expression of pro-inflammatory mediators as well as RANKL. NAC modulates bone reabsorption and immune response through its direct and indirect (via inhibition of inflammatory cytokine expression) effects in inhibiting NF- κ B activation.

Table1: Use of N-acetyl cysteine in several diseases and experimental models with clinical and/or laboratorial significance

Model/Disease	Host	Finding	Reference
Chronic obstructive pulmonar disease	Human	NAC decreased the deterioration of lung disease	Stiksa <i>et al</i> , 1992
TNF- α expression	Mice	NAC protected against LPS toxicity and inhibited the increase of TNF- α levels in LPS-treated mice	Peristeris <i>et al</i> , 1992
Bacterial phagocytosis	Human	NAC improved bacterial activity of both alveolar macrophage and PMNs. Moreover, NAC protected cell death in this cells	Oddera <i>et al</i> , 1994
HIV	Human	Oral NAC supplementation restored GSH levels and improved human survival	Herzenberg <i>et al</i> , 1997
Influenza	Human	Oral NAC decrease clinical influenza symptoms and the cell-mediated immunity was improved about influenza seasons	De Flora <i>et al</i> , 1997
T-lymphocyte activation	Mice	NAC restored GSH levels and Th1 cytokines response after GSH depletion	Peterson <i>et al</i> , 1998
Human chagas disease	Mice	NAC showed a protective effects against <i>Thypanosoma cruzi</i> partially restoring CD4/CD8 ratios	Guevara <i>et al</i> , 2000
HIV	Human	Oral NAC supplementation increased NK cell activity	Breitkreutz <i>et al</i> , 2000
Leishmania major infection	Mice	Increase of GSH levels by NAC lead to delayed lesions and concurrent increase in inflammatory cytokine production	Rocha-Vieira <i>et al</i> , 2003
Idiopathic pulmonary fibrosis	Human	NAC showed less deterioration in lung	Demedts <i>et al</i> , 2005

		function over one year	
Leucocyte adhesion	Human	NAC attenuates the increased expression of CD11b in either LPS or IL-8-stimulated	Nandate <i>et al</i> , 2005
Acute pancreatitis	Rats	NAC reduced the pancreatic injury and enhanced the producing of IL-10 in acinar cells	Ramudo <i>et al</i> , 2005
Immune response	Human gingival fibroblasts	NAC suppressed LPS-induced cytokines IL-1- β , IL-6, IL-8 and TNF- α	Kim do <i>et al</i> , 2007
Ischemic reperfusion injury	Pigs	NAC reduced inflammatory reaction during the warm ischemic phase	Geudens <i>et al</i> , 2008
Preterm labor	Rats	Pretreatment with NAC decreased inflammatory effect of LPS-induced TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , prostaglandin-2 and cyclooxygenase-2 in the placenta	Paintlia <i>et al</i> , 2008
Alveolar bone loss	Rats	Systemic NAC decreased alveolar bone loss	Toker <i>et al</i> , 2009
Cystic fibrosis	Human	NAC increased cellular GSH in induced sputum	Dauletbaev <i>et al</i> , 2009
Type II diabetes mellitus	Human	Oral NAC therapy decreased c-reactive protein levels	Jeremias <i>et al</i> , 2009
Heterogeneous bone graft	Rats	NAC improved bone regeneration using inorganic biomaterials	Yamada <i>et al</i> , 2010
Healing of hard tissues	Rats	NAC recovered gingival fibroblasts and prevented suppression of alkaline phosphatase activity in culture with bacteria	Yamada <i>et al</i> , 2011
Oxidative stress in osteoblasts	Rats	NAC in co-treatment with H ₂ O ₂ recovered gene expression of collagen type I, osteopontin and osteocalcin	Ueno <i>et al</i> , 2011
Brain injury	Rats	NAC prevented nuclear	Thakurta <i>et al</i> ,

		translocation of NF- κ B and inflammatory injury by IL-1 β , IL-6, and TNF- α	2012
Fetal inflammatory injury	Rats	Maternal NAC attenuated LPS-induced IL-6 and TNF- α in the amniotic fluid and limited LPS-induced cellular infiltration of leukocytes and chemokines expression in placenta	Beloosesky <i>et al</i> , 2013
Type I diabetes mellitus	Rats	Systemic NAC reduced severity of insulates	Bogdani <i>et al</i> , 2013
Bone regeneration	Rats	NAC accelerated the bone regeneration	Yamada <i>et al</i> , 2013
Skin tumorigenesis	Mice	NAC decreased cell proliferation probably inhibiting MAPKs and NF- κ B signaling	Pal <i>et al</i> , 2013
Extracellular matrix regeneration	Enzymatic assay	NAC inhibited hyaluronidase	Sunitha <i>et al</i> , 2013
Oxidative DNA damage	Human	NAC reduced oxidative DNA damage in CD4 T cells	Marthandan <i>et al</i> , 2013

Figure 1:

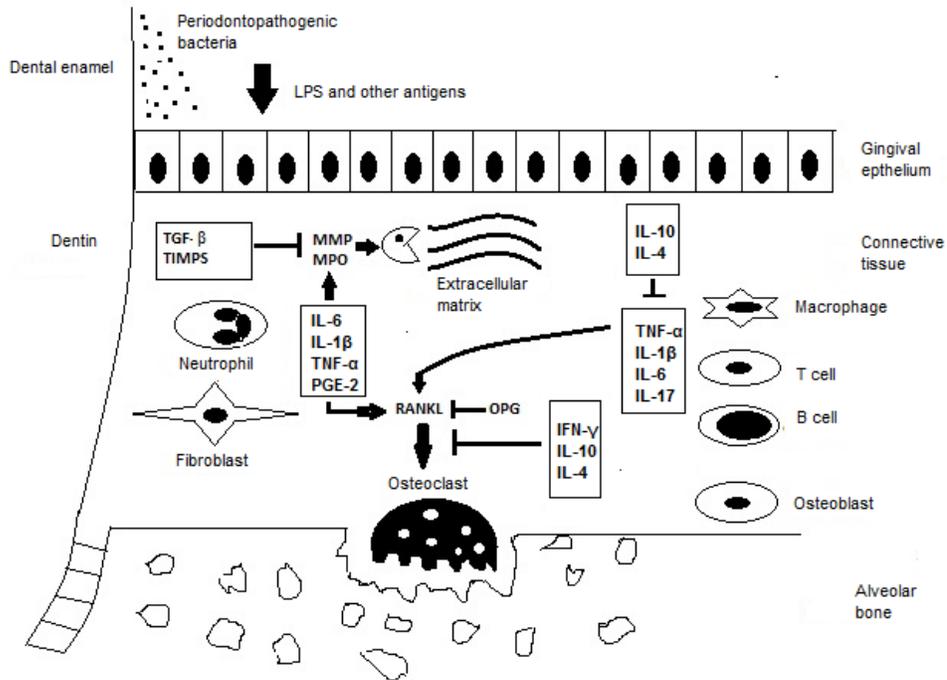
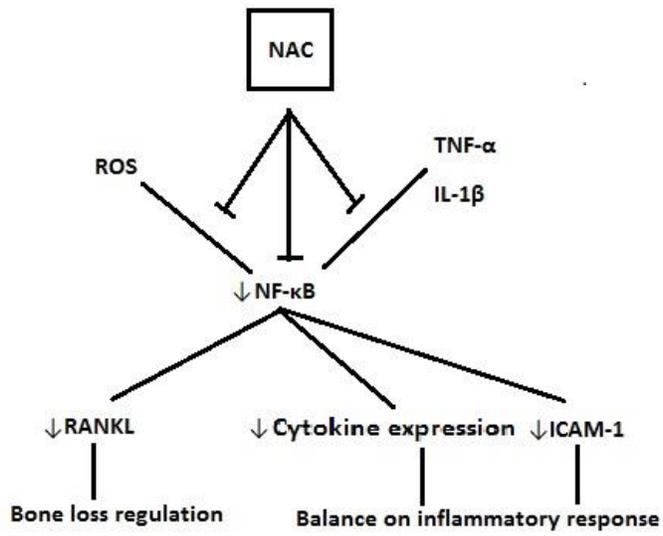


Figure 2:



Anexo II: Artigo submetido para a Revista The Journal of Periodontology

17-Jan-2014

Dear Dr. Dutra:

Thank you for submitting your manuscript, "N-acetyl cysteine decreases alveolar bone loss and modulates cytokine expression and in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infected mice" (JOP-14-0036), to the Journal of Periodontology. Your manuscript will be forwarded to Dr. Kornman or an Associate Editor prior to peer review.

As a reminder, the Journal of Periodontology requires all authors to submit a conflict of interest and financial disclosure form. If you have not yet done this, please e-mail or fax these forms to Jerry Eberle in the Editorial Office (e-mail: jerry@perio.org; fax: 312.573.3225). A copy of the form is attached for your use.

You may track the status of your submission on the web at <http://mc.manuscriptcentral.com/jperio>. To access the system, you will need to login with your User ID and password. The manuscript status can be tracked in your Author Center.

If you have any questions, or if I can provide further information, please do not hesitate to contact me at julie@perio.org. It will be most helpful if you would include both your manuscript title and reference number in any correspondence.

Sincerely,

Julie Daw

Managing Editor

Journal of Periodontology

N-acetyl cysteine decreases alveolar bone loss and modulates cytokine expression in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infected mice

Comentado [T1]: Eu colocaria o ..decreases alveolar bone... antes pela importancia deste fenótipo

Leonardo Silveira Damasceno*, Celso Martins Queiroz-Junior†, Mila Fernandes Moreira Madeira‡, Tarcília Aparecida da Silva†, Kenneth J. Gollob §, I and Walderez Ornelas Dutra*, I

* Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais

† Department of Oral Surgery and Pathology, Federal University of Minas Gerais

‡ Department of Microbiology, Federal University of Minas Gerais

§ Instituto de Ensino e Pesquisa, Hospital Santa Casa-BH

I Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais - INCT-DT

Corresponding author:

Walderez Ornelas Dutra, PhD.

Laboratory of Cell-Cell Interactions, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Brazil. email: waldutra@gmail.com

Source of funding: The study was partly funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Word count: 3425

Number of figures and table: 6

Running title: N-acetyl cysteine modulates immune response and bone loss in periodontitis

Key finding: N-acetyl cysteine treatment significantly protects against alveolar bone loss, and modulates proinflammatory cytokines while restoring the levels of the modulatory cytokine IL-10.

Abstract

Background: The destruction of periodontal tissue is characterized by an intense local immune/inflammatory response. The aim of this study was to evaluate whether N-acetyl cysteine (NAC), an immune modulatory molecule, would prevent alveolar bone loss and modulate the immune response in experimentally induced periodontal disease (PD) in mice.

Methods: C57Bl/6 mice infected with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* were treated daily with NAC. Animals were euthanized forty-eight hours and 45 days after infection. We measured systemic GSH, as well as the oxidized form, GSSG. Maxillae were evaluated by morphometric analysis to determine alveolar bone loss, and by colorimetric analysis to evaluate myeloperoxidase activity. Cervical lymphonodes were processed for flow cytometric analysis of proinflammatory cytokine (TNF-alpha, IL-6, IL-17 and IFN-gamma) and IL-10 expression.

Results: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection significantly increases alveolar bone loss and myeloperoxidase (MPO) activity. Moreover, bacterial infection was accompanied by augmented the expression of the proinflammatory cytokines TNF-alpha and IL-17, and significantly decreased the modulatory cytokine IL-10. NAC treatment significantly protected against alveolar bone loss. This clinical data was associated with decreased MPO activity, and restored levels of total GSH and GSSG. In addition, NAC significantly modulated proinflammatory cytokine expression and restored the expression of the modulatory cytokine IL-10.

Comentado [T2] : Acho pouco claro desta forma como está escrito

Conclusions: NAC showed a significant capacity to modulate the immune response and prevent alveolar bone loss in a model of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced PD in mice.

Key words: Periodontal disease, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, N-acetyl cysteine, Immunomodulation, Cytokines

Introduction:

The destruction of the periodontal tissue (periodontitis) is characterized by an intense local inflammatory response triggered by antigens from periodontal bacteria present in the subgingival biofilm. In some patients, deregulation of production of inflammatory mediators in the periodontal tissues (such as pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF-alpha and IL-17) produces an increase in the expression of certain peroxidases (i.e. myeloperoxidase - MPO) and proteases (i.e. matrix metalloproteinases - MMPs), as well as of molecules related to bone homeostasis (RANK-RANK-L), which promote the destruction of the extracellular matrix and activates osteoclasts to degrade the alveolar bone¹.

Recent studies have suggested that the control of the immune and inflammatory periodontal response may act to prevent the onset and development of periodontal disease^{2,3,4} such as in aggressive periodontitis, where there is a failure to return to tissue homeostasis in the presence of the bacterium *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*)^{2,3}.

Glutathione (GSH) is an intracellular tripeptide present in eukaryotic cells and acts primarily to protect against the toxic effects of reactive oxygen species (ROS) through its redox activity⁵. GSH plays an important role in modulating the immune response through an initial shift to a profile related to Th1 T cells cytokines⁶, as well as control of NF κ B activity⁷. Moreover, low levels of GSH have been associated with chronic diseases such as cystic fibrosis, Idiopathic pulmonary fibrosis, AIDS and periodontal disease (PD)⁸⁻¹⁰. It has been shown that high levels

of oxidized glutathione (GSSG) is an indicative of oxidative stress⁵, and biopsy of gingival tissue from patients with periodontitis have demonstrated higher levels of GSSG than patients without (PD)¹¹.

N-acetyl cysteine (NAC) is an acetylated cysteine variant, which is converted into metabolites capable of stimulating the synthesis of GSH. The systemic use of NAC has been associated with the prevention and protection of chronic diseases^{12,13}. In gingival fibroblasts culture, NAC decreased mRNA for inflammatory cytokines in the presence of LPS from *Aa* and *Porphyromonas gingivalis*¹⁴. In addition, systemic NAC was able to decrease ligature-induced alveolar bone loss in rats¹⁵. While treatment for PD is available, the disease is recurrent, and given its local and systemic effects in general health, prevention of its establishment is still the best strategy. Thus, finding effective preventive measures that are safe and cost effective is critical.

Given the immunomodulatory effects of NAC, as well as its protective activity in several diseases, the aim of this study was to evaluate whether systemic NAC would prevent alveolar bone loss and modulate the immune response by interfering with the expression of cytokines IL-10, TNF-alpha, IL-17, IL-6 and IFN-gamma, as well as MPO, in murine PD induced by *Aa*. Our results showed that NAC treatment decreases bone loss and modulates the inflammatory response in infected mice. These results may suggest the use of NAC as a preventive measure to PD.

Materials and methods

Animals

Five-week-old male C57BL/6 mice were used in this study. The animals were kept under standard conditions in the Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Brazil. The experimental design used in this study was approved by the institutional ethics committee for animal experimentation (CETEA / UFMG), under the protocol number 135/11.

Experimental periodontitis:

Periodontal disease was induced in mice as described previously^{16,17}. Briefly, induction of periodontal infection was carried out by oral inoculation of 1×10^9 CFU of the periodontopathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strain Y4⁺ in 100 μ l phosphate buffered saline (PBS) with 1.5% carboxymethylcellulose (CMC) plus inoculation of 10 μ l of the same inoculum in PBS on the palate between first and second molars, three times every 48 hours (on day 0, 2 and 4). Mice were euthanized and evaluated 48 hours and 45 days post the last infection. Negative controls included sham-infected mice.

NAC treatment:

Forty mice were divided into 4 groups: control group, NAC group (NAC treatment but no *Aa*-induced infection), infected group (*Aa*-induced infection) and infected plus and NAC treatment group. Two days before induction of experimental PD, the mice treated with NAC started a regimen of 400mg/Kg day NAC⁺ consumption in water, according to a previous study from our group¹². The control

and infected groups received water only. The water was changed daily throughout the course of the trial and the mean consumption was recorded.

Quantification of alveolar bone loss

After 45 days of initial *Aa* infection, maxillae of five mice/group were evaluated morphometrically for the area of alveolar bone loss in the palatal aspect of the first upper molar using software to image processing and analysis[‡] as described^{16,17}. Right hemi-maxillae was dissected and possessed in 10% hydrogen peroxide two times to remove soft tissue. Then, the sample was immersed in 1% methylene blue to stain the cement-enamel junction. In further experiments, the left hemi-maxillae were collected and store at -20°C until the MPO immunoenzymatic assay.

Evaluation of myeloperoxidase (MPO)

The neutrophil enzyme marker MPO were quantified colorimetrically (absorbance of 450nm) by enzymatic reactions as described previously¹⁶.

Total GSH, reduced GSH and GSSG in peripheral blood serum

Peripheral blood from four mice per group was collected in heparinized tubes under anesthesia and analgesia with ketamine and xylazine 48 hours after the last infection. The samples were immediately transferred to Eppendorf tubes and 5% metaphosphoric acid[§], in the proportion of 1:1 (metaphosphoric acid / whole blood) was added. The samples were incubated for 5 minutes. Then, the samples were centrifuged at 10000g for 5 minutes and the supernatant was collected. The evaluation for the total GSH and GSSG was performed using a

detection kit for total GSH and GSSG according to the manufacturer[¶]. Samples were analyzed in a spectrophotometer with absorbance at 412nm. To quantify reduced GSH, we subtract the total GSH by GSSG.

Flow cytometry analysis of IL- 10, IL- 6, TNF- alpha, IL -17 and IFN- gamma

To assess cytokine expression by cells from cervical lymphonodes, five animals per group were euthanized 48 hours after the last infection. The lymphonodes were macerated in ice to extract cells. Subsequently, the cells were centrifuged at 500g for 8 minutes and resuspended in 1 ml of cold RPMI. The cells were counted and seeded in 96/wells plate at the concentration of 2×10^5 cells per well. Then, the samples were processed to stain for surface molecules and intracellular cytokines for flow cytometry, as described previously¹⁸. FITC conjugated anti-mouse CD4 and CD8, as well as PE conjugated anti-cytokine antibodies[¶] (IL-10, TNF-alpha, IFN-gamma, IL-17, IL-6) were used for the straining. After fixation, samples were transferred to tubes, read in flow cytometer[#] and analyzed in appropriate software^{**}.

Data analysis

Data are presented as mean \pm SD and the statistical significance was detected by analyses of variance (one way ANOVA), followed by Tukey posttest analysis or *T* test^{††}. Statistically significant differences were considered when results showed $p < 0.05$.

Results:

Systemic NAC treatment decreased alveolar bone loss in experimental model of periodontitis

The alveolar bone loss is an indication of PD induced by *Aa* in this model¹⁹. The results showed that mice infected with *Aa* had a clear bone loss when compared with the control group (Figure 1 – C versus I - $p < 0.05$). Mice infected and treated with NAC systemically showed significant reduction in bone loss when compared to infected group (Figure 1 – NI versus I - $p < 0.05$).

Systemic NAC decreases the activity of myeloperoxidase in maxillae

Given myeloperoxidase (MPO) activity is an important indicator of neutrophil recruitment and PD^{20,21}, we measured its levels in the maxillae of mice submitted to treatment with NAC. As expected, the infected group showed a significant increase in MPO activity as compared to the control group (Figure 2). Although MPO was higher in NAC treated group as compared to control, NAC treatment was able to significantly reduce MPO as compared with infected group.

Effects of systemic NAC in total GSH, reduced GSH, and GSSG from peripheral blood

Changes in the amount of total GSH, reduced GSH, GSSG, and ratio GSH/GSSG are indicative of oxidative stress⁵. To assess whether infection with *Aa* and NAC treatment can alter GSH, we investigated the levels of this tripeptide and the different forms (above mentioned) in the peripheral blood of mice submitted to the different treatment. Initially, we defined a GSH curve to quantify total GSH, reduced GSH and GSSG. There was no significant difference in reduced GSH

between groups (data not shown). The total GSH was significantly different comparing infected vs. infected plus NAC groups (Figure 3a).

Interestingly, GSSG was also significantly reduced upon treatment of infected animals with NAC (Figure 3B), demonstrating a disruption in the redox state in infected mice. We did not observe a statistical difference in the GSH/GSSG ratio between groups (data not shown).

Systemic NAC treatment of infected animals modulates the expression of the inflammatory cytokines TNF-alpha, IL-17 and IFN-gamma, as well as of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in lymphocytes and antigen presenting cells populations

To evaluate the ability of NAC to modulate the immune response through changes in cytokines, we investigated the frequency of cells expressing the inflammatory cytokines TNF-alpha, IL-17, IL-6 and IFN-gamma, and the modulatory cytokine IL-10 by CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, as well as by antigen-presenting cells of cervical lymph nodes. The data showed no significant differences in the frequency of IL-6⁺ cells for all groups (data not shown). The frequency of total lymphocytes, as well as CD4⁺ lymphocytes expressing TNF-alpha was significantly higher in infected group as compared to the control group (Figure 4A). However, treatment with NAC significantly reduced TNF-alpha in total lymphocytes, CD4⁺ T lymphocytes and antigen-presenting cells compared to infected non-treated group, showing that NAC restores the levels of TNF-alpha to those observed in control group (Figure 4A).

There was no statistical difference in the frequency of IFN-gamma-expressing cells amongst total lymphocytes and CD4⁺ T lymphocytes between different groups. However, IFN-gamma expression by CD8⁺ lymphocytes was significantly reduced after infection, but not altered if mice were treated with NAC prior to the infection (Figure 4B).

IL-17 expression was significantly higher in total lymphocytes from infected group compared with control and NAC treated groups (Figure 4C). Similarly, there was a significant increase in CD4⁺ IL-17⁺ cells in infected group compared to the uninfected groups. Interestingly, NAC was able to negatively modulate IL-17 by total lymphocytes and CD4⁺ IL-17⁺ T lymphocytes of infected, NAC treated group, when compared with infected group (Figure 4C).

Interestingly, NAC has effects on the levels of the modulatory cytokine IL-10, both at the frequency of cells expressing this cytokine, as well as the intensity of expression on a cell-per-cell basis (Figure 5). Infected groups significantly decreased the frequency and mean intensity of expression of IL-10 compared with the control group in antigen-presenting cells (Figure 5A and B). However, this pattern was restored to normal levels in NAC-treated infected mice (Figure 5A and B). Moreover, NAC increased significantly the frequency of IL-10 expression by total lymphocytes and CD4⁺ T lymphocytes in NAC-treated infected mice when compared with infected group (Figure 5A and B).

Comparing the ratio of modulatory cytokine IL-10 with inflammatory cytokine TNF-alpha in antigen-presenting cells, total lymphocytes and CD4⁺ T lymphocytes,

we observed a significant shift towards an anti-inflammatory profile in NAC-treated infected mice when compared with the infected group, due to the increase in IL-10 and decrease in TNF-alpha expression in the NAC treated infected mice. (Table 1).

Discussion

Periodontal tissues, once challenged by the bacteria of the subgingival biofilm, may develop an intense and uncontrolled immune response that can result in the onset and development of periodontitis^{1,2}. Chronic inflammation is a characteristic of periodontitis, where a failure to return to homeostasis favors the release of inflammatory mediators such as MPO, MMPs and RANKL that degrade both the soft and hard periodontal tissue¹. Currently, researches are focused on alternatives that may promote the control of periodontal immune/inflammatory response and the return to tissue homeostasis²⁻⁴. Thus, while an effective immune response is important in periodontitis, we believe that it must be controlled and protective.

In this study, we evaluated the effects of NAC treatment modulating the inflammatory response in an experimental model of PD. Experimental models are essential tools to study the effects of adjunctive new therapies how they affect the host response in the course of infections. The murine experimental model of PD used in this work is an interesting model as it allows for the development of disease while it does not use external agents (i.e. ligature) that may influence the local immune response¹⁹.

Comentado [T3] : Eu colocaria algo assim pq o tratamento convencional da DP tem de ser mantido

NAC is an acetylated cysteine with anti-oxidant properties that is able to raise the levels of GSH and has been used clinically in humans and experimental models of chronic diseases, toward their control and/or treatment^{12,13}. Our group demonstrated that systemic NAC was able to significantly reduce injury resulting from infection with *Leishmania major* in susceptible mice¹². Also, systemic NAC was able to significantly decrease bone loss in ligature-induced alveolar bone loss in rats¹⁵. Changes in GSH levels, which can be affected by NAC, have been correlated with chronic diseases, including PD⁸⁻¹⁰. Reduced GSH is able to promote the reduction of intracellular ROS. During this process, reduced GSH is oxidized binding to other GSH molecule, and releasing water. This dimeric form, GSSG (oxidized GSH), can be reduced back to GSH by the enzyme GSH reductase via NADPH. Increased levels of GSSG are correlated with oxidative stress⁵. These altered levels of GSSG can be observed in the gingival crevicular fluid in chronic periodontitis¹¹. In this study, we observed a significant decrease in GSSG upon treatment of mice infected with *Aa* with NAC. These data suggest that NAC is reducing the oxidant stress in these animals and agrees with other findings who demonstrated that in vivo treatment of rats with NAC reduced primary inflammatory events and was also associated with a decrease in GSSG²². Thus, this leads us to understand that NAC helps to reduce oxidative stress in peripheral blood in this model.

This is the first study evaluating the effects of NAC modulation in experimental PD induced by periodontopathogenic bacteria. Assessing the alveolar

bone loss, our results demonstrated that NAC treatment was able to decrease bone loss in this experimental model. The mechanisms by which NAC leads to the reduction of alveolar bone loss are not clear, however, it is possible to hypothesize that NAC may act indirectly controlling the production of RANKL, since NAC regulates NF κ B production, an inducer of RANKL activation^{23,24}. Moreover, NAC is able to reduce the RANKL induced differentiation of monocyte-macrophage into osteoclasts²⁵. Alternatively, the control of bone loss can be associated with the activity of enzymes and cytokines that can indirectly influence the inflammatory process. In order to address this question, we evaluated the effects of NAC in the expression of MPO and immunoregulatory cytokines.

MPO is a peroxidase produced mainly by neutrophils to degrade bacteria and other pathogens²⁶. However, altered levels of MPO can generate a breakdown on extracellular matrix²⁷. Elevated MPO levels in the gingival sulcus fluid has been correlated with progressive chronic periodontitis and these levels tend to decrease after clinical treatment^{11,28}. Moreover, the -463G/A polymorphism in the MPO gene has been associated with risk of developing aggressive periodontitis in Turkish patients²⁹. In this study, we showed that MPO activity is significantly higher in the maxilla of *Aa*-infected mice, which is in agreement with a previous study^{16,17}. However, in infected mice treated with NAC, MPO was significantly reduced when compared with the infected, non-treated, group. Thus, NAC may be able to control, at least in part, the destruction of the extracellular matrix in PD by controlling the MPO activity, as a mechanism to decrease bone loss.

Studies have shown that cytokines released by host in periodontal sites are associated with the onset of periodontal destruction¹. It has been suggested that the progression of PD is due to a combination of factors such as the presence of periodontal bacteria, elevated levels of inflammatory cytokines (i.e. TNF- alpha, IL - 1- β , IL- 6, and IL- 17), the production and activation of MMPs and RANKL and relative low levels of the modulatory cytokine IL-10^{1,30,31}.

IL-6 knockout mice demonstrated less alveolar bone loss in response to infection with *Porphyromonas gingivalis* compared to wildtype animals³². However, in this present study, there was no significant difference in levels of IL-6 in cervical lymphonodes from the mice of different groups. In agreement with our results, another study with a similar experimental model also showed no significant difference in IL-6 levels in serum from Aa infected and uninfected mice¹⁷.

The proinflammatory cytokine TNF-alpha has a significant relationship with bone loss in PD¹. The mechanism by which TNF-alpha induces inflammatory bone resorption includes activation of osteoblast and stromal cells to express macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and RANKL. In addition, it further induces other inflammatory cytokines such as IL-6 and IL1- β to increase osteoclastogenesis and bone resorption³³. In the calvarial model in mice, recombinant TNF-alpha accelerated the progression of bone loss³⁴. In TNF-alpha receptor-1-knockout mice infected with Aa, a significant reduction of bone loss and inflammation was observed³⁵. As opposed to the proinflammatory activity of TNF-alpha, the anti-inflammatory activities of IL-10 have been associated with less

Comentado [T4]: Leo como a discussão esta muito extensa minha sugestão é tentar reduzir na parte dos dados que foram negativos

severe forms of periodontitis³¹. Moreover, IL-10 potently inhibits the expression of RANKL NFATc1-induced and suppresses osteoclast differentiation and induction of bone resorption, showing a protective potential in periodontitis³³.

We observed that the infected group showed a significant increase in the levels of TNF-alpha in total lymphocytes and CD4⁺ T lymphocytes from cervical lymphonodes. This result is similar to that observed by ELISA test in the maxilla of mice infected with Aa¹⁷. In contrast, IL-10 expression by antigen presenting cells, as well as mean fluorescence intensity of IL-10 in antigen-presenting cells and CD4⁺ was markedly reduced in infected group as compared with uninfected animals. This finding is in agreement with a previous study that showed no mRNA for IL-10 in the maxilla of mice until 15 days after infection with Aa¹⁹.

Importantly, we showed that NAC-treated infected mice significantly reduced TNF-alpha levels in antigen presenting cells, total lymphocytes, and CD4⁺ T lymphocytes populations when compared to infected group. Moreover, NAC was able to restore IL-10 levels in total lymphocytes, CD4⁺ T and antigen-presenting cells, to the levels observed in non-infected group. Another interesting fact was that NAC treatment significantly increased the ratio IL-10/TNF-alpha in antigen-presenting cells, total lymphocytes and CD4⁺ T lymphocytes. These data together suggest that NAC can exert a modulatory effect in the immune response during the development of experimental periodontitis in mice, favoring the establishment of a protective immune response.

Despite the high levels of IFN-gamma shown to be present in inflamed periodontal tissues, this inflammatory cytokine is considered an important cytokine to induce the activation of macrophages to phagocytosis of pathogens, antigen uptake, production of other cytokines, chemokines and microbicidal molecules³⁶. Our results showed no statistical difference in IFN-gamma in total lymphocytes and T lymphocytes CD4⁺ amongst all groups, as well as no significant difference in IFN-gamma in CD8⁺ T lymphocytes between the infected group and the control group. However, NAC-treated infected mice showed a significant increase in percentage and mean intensity fluorescence of IFN-gamma expression by CD8⁺ T lymphocytes. This can be explained by the fact that *Aa* can be internalized into oral cells³⁷ and to present antigens by MHC class I to cytotoxic CD8⁺ cells, increasing IFN-gamma production by these cells, which could be important to potentiate bacteria uptake, leading to the elimination of the pathogen and, thus, helping to develop a protective response.

The proinflammatory cytokine IL-17 is described as an inducer of RANKL³⁸. Human studies suggest its overexpression in tissue of patients with chronic periodontitis^{39,40}. We demonstrated, in this study, that IL-17 expression is significantly elevated in total lymphocytes and CD4⁺ T cells from the infected group compared with uninfected mice. Again, NAC was able to modulate an inflammatory cytokine profile by reducing the frequency of IL-17 in total lymphocytes and CD4⁺ T cells, when compared with infected group.

Conclusions

NAC showed a significant capacity to modulate the immune response and prevent alveolar bone loss in an experimental model of infection with the periodontal bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. These results clearly show the potential use of NAC as an immunomodulatory therapy that can help prevent and treat periodontal diseases.

Acknowledgments

The study was partially funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), INCT-DT and FAPEMIG.

Footnotes

* ATCC 43718

† Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

‡ Image J software (NIH, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA)

§ Dinâmica Química, Diadema, SP, Brazil

|| NWK-GSH01 Kit (Life Science Northwest Specialties, Vancouver, WA, USA)

¶ eBiosciense, San Diego, CA, USA

FACS Canto II, BD Biosciences, San Jose, California, USA

** Flow Jo (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA)

†† Graph- Pad Software 4.0 (San Diego, CA, USA)

References

1. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2008 Aug;79(8 Suppl):1585-1591.
2. Van Dyke TE. The management of inflammation in periodontal disease. *J Periodontol* 2008;79(8 Suppl):1601-1608.
3. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res* 2010 Dec;89(12):1349-1363.
4. Glowacki AJ, Yoshizawa S, Jhunjhunwala S, Vieira AE, Garlet GP, Sfeir C, Little SR. Prevention of inflammation-mediated bone loss in murine and canine periodontal disease via recruitment of regulatory lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013 Nov 12;110(46):18525-18530.
5. Meister A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res* 1994;54(7):1969-1975.
6. Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh C. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Immunology* 1998;95:3071-3076.
7. Enwonwu CO, Meeks VI. Bionutrition and oral cancer in humans. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995;6(1):5-17.
8. Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J* 2000;16(3):534-554.

9. Dröge W, Breitkreutz R. Glutathione and immune function. *Proc Nutr Soc* 2000;59(4):595-600.
10. Chapple IL, Brock G, Eftimiadi C, Matthews JB. Glutathione in gingival crevicular fluid and its relation to local antioxidant capacity in periodontal health and disease. *Mol Pathol* 2002 Dec;55(6):367-373.
11. Borges I Jr, Moreira EA, Filho DW, de Oliveira TB, da Silva MB, Fröde TS. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. *Mediators Inflamm* 2007;2007:45794.
12. Rocha-Vieira E, Ferreira E, Vianna P, De Faria DR, Gaze ST, Dutra WO, Gollob KJ. Histopathological outcome of Leishmania major-infected BALB/c mice is improved by oral treatment with N-acetyl-L-cysteine. *Immunology* 2003;108:401-408.
13. Venketaraman V, Dayaram YK, Amin AG, Ngo R, Green RM, Talaue MT, Mann J, Connell N. Role of glutathione in macrophage control of mycobacteria. *Infection and Immunity* 2003; 71(4): 1864-1871.
14. Kim do Y, Jun JH, Lee HL, Woo KM, Ryoo HM, Kim GS, Baek JH, Han SB. N-acetylcysteine prevents LPS-induced pro-inflammatory cytokines and MMP2 production in gingival fibroblasts. *Arch Pharm Res* 2007 Oct;30(10):1283-1292.
15. Toker H, Ozdemir H, Eren K, Ozer H, Sahin G. N-acetylcysteine, a thiol antioxidant, decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J. Periodontol* 2009;80(4):672-678.

16. Madeira MF, Queiroz-Junior CM, Costa GM, Santos PC, Silveira EM, Garlet GP, Cisalpino PS, Teixeira MM, Silva TA, Souza Dda G. MIF induces osteoclast differentiation and contributes to progression of periodontal disease in mice. *Microbes Infect* 2012 Feb;14(2):198-206.
17. Queiroz-Junior CM, Madeira MF, Coelho FM, de Oliveira CR, Cândido LC, Garlet GP, Teixeira MM, de Souza Dda G, Silva TA. Experimental arthritis exacerbates *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced periodontitis in mice. *J Clin Periodontol* 2012 Jul;39(7):608-616.
18. Dutra WO, Colley DG, Pinto-Dias JC, Gazzinelli G, Brener Z, Pereira ME, Coffman RL, Correa-Oliveira R, Carvalho-Parra JF. Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5+ B cells or activated T cells of chagasic patients, respectively. *Scand J Immunol* 2000 Jan;51(1):91-97.
19. Garlet GP, Avila-Campos MJ, Milanezi CM, Ferreira BR, Silva JS. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. *Microbes Infect* 2005 Apr;7(4):738-747.
20. Queiroz-Junior CM, Pacheco CM, Fonseca AH, Klein A, Caliari MV, de Francischi JN. Myeloperoxidase content is a marker of systemic inflammation in a chronic condition: the example given by the periodontal disease in rats. *Mediators Inflamm* 2009;2009:760837.

21. Meschiari CA, Marcaccini AM, Santos Moura BC, Zuardi LR, Tanus-Santos JE, Gerlach RF. Salivary MMPs, TIMPs, and MPO levels in periodontal disease patients and controls. *Clin Chim Acta* 2013 Jun 5;421:140-146.
22. Serrano-Mollar A, Closa D, Prats N, Blesa S, Martinez-Losa M, Cortijo J, Estrela JM, Morcillo EJ, Bulbena O. In vivo antioxidant treatment protects against bleomycin-induced lung damage in rats. *Br J Pharmacol* 2003 Mar;138(6):1037-1048.
23. D'Amore M, Fanelli M, D'Amore S, Fontana A, Minenna G. Receptor activator of NF(Kappa)B ligand/osteoprotegerin (RANKL/OPG) system and osteopontin (OPN) serum levels in a population of apulian postmenopausal women. *Panminerva Med* 2006 Dec;48(4):215-221.
24. Finn NA, Kemp ML. Pro-oxidant and antioxidant effects of N-acetylcysteine regulate doxorubicin-induced NF-kappa B activity in leukemic cells. *Mol Biosyst* 2012 Feb;8(2):650-662.
25. Lee NK, Choi YG, Baik JY, Han SY, Jeong DW, Bae YS, Kim N, Lee SY. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood* 2005 Aug 1;106(3):852-859.
26. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005 May;77(5):598-625.
27. Lee DG, Cho BH, Hervey J, Daynes RA. The role of neutrophils in tissue localized cell-mediated immunologic responses: I. The intensity of contact-

- type and delayed-type hypersensitivity responses may be influenced by the extent of extracellular matrix degradation by neutrophil proteases. *Reg Immunol* 1988 Nov-Dec;1(3):149-162.
28. Hernández M, Gamonal J, Tervahartiala T, Mäntylä P, Rivera O, Dezerega A, Dutzan N, Sorsa T. Associations between matrix metalloproteinase-8 and -14 and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid from subjects with progressive chronic periodontitis: a longitudinal study. *J Periodontol* 2010 Nov;81(11):1644-1652.
29. Erciyas K, Pehlivan S, Sever T, Orbak R. Genetic variation of myeloperoxidase gene contributes to aggressive periodontitis: a preliminary association study in Turkish population. *Dis Markers* 2010;28(2):95-99.
30. Schenkein HA, Koertge TE, Brooks CN, Sabatini R, Purkall DE, Tew JG. IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. *J Dent Res* 2010 Sep;89(9):943-947.
31. Lima PM, Souza PE, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO. Aggressive and chronic periodontitis correlate with distinct cellular sources of key immunoregulatory cytokines. *J Periodontol* 2011 Jan;82(1):86-95.
32. Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC. CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun* 1999 Jun;67(6):2804-2809.

33. Ivashkiv LB, Zhao B, Park-Min KH, Takami M. Feedback inhibition of osteoclastogenesis during inflammation by IL-10, M-CSF receptor shedding, and induction of IRF8. *Ann N Y Acad Sci* 2011 Nov;1237:88-94.
34. Gaspersic R, Stiblar-Martincic D, Osredkar J, Skaleric U. In vivo administration of recombinant TNF-alpha promotes bone resorption in mice. *J Periodontal Res* 2003 Aug;38(4):446-448.
35. Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, Silva JS. The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clin Exp Immunol* 2007 Jan;147(1):128-138.
36. Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Garlet TP, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, Silva JS. The essential role of IFN-gamma in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *Microbes Infect* 2008 Apr;10(5):489-496.
37. Meyer DH, Rose JE, Lippmann JE, Fives-Taylor PM. Microtubules are associated with intracellular movement and spread of the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1999 Dec;67(12):6518-6525.
38. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, Tanaka S, Kodama T, Akira S, Iwakura Y, Cua DJ, Takayanagi H. Th17

- functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 2006 Nov 27;203(12):2673-82.
39. Cardoso CR, Garlet GP, Crippa GE, Rosa AL, Júnior WM, Rossi MA, Silva JS. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 2009 Feb;24(1):1-6.
40. Adibrad M, Deyhimi P, Ganjalikhani Hakemi M, Behfarnia P, Shahabuei M, Rafiee L. Signs of the presence of Th17 cells in chronic periodontal disease. *J Periodontal Res* 2012 Aug;47(4):525-531.

Figure legends**Figure 1 – NAC reduces alveolar bone loss in experimental model of periodontal disease**

(a) Representative photographs of maxillae specimens of control group (C), infected group (I), and infected plus NAC 10mM treatment group (IN). I group showed the exacerbation of alveolar bone loss (arrows), however, NAC protected against alveolar bone loss (head arrow).

(b) Morphometric analysis of alveolar bone loss in maxillae. Infected group (I) show significant alveolar bone loss compared to control group (C). NAC treatment protected against alveolar bone loss in infected plus NAC 10mM treatment group (IN). CEJ/ABC (mm²) – inter cemental-enamel junction/alveolar bone crest area in mm². 1,2 indicates statically differences between the groups, where similar numbers represent the compared groups that are different. $P < 0.05$.

Figure 2- Systemic NAC decreases MPO activity

Colorimetric analysis to the local MPO activity in the three different groups (5 mice/group). Infected group (I) show significant increase in MPO activity compared to control group (C). Systemic NAC treatment significantly decrease MPO activity in infected plus NAC 10mM treatment group (IN) compared with infected group (I). 1,2,3 indicates statically differences between the groups where similar numbers represent the compared groups that are different. $P < 0.05$.

Figure 3- NAC decrease GSSG in peripheral blood

Colorimetric analysis of total GSH (A) and GSSG. (B) in peripheral blood of mice submitted to the different treatment (5 mice/group). Infected group (I) show significant increase in total GSH compared with infected plus NAC 10mM treatment group (IN). Infected plus NAC 10mM treatment group (IN) significantly reduced GSSG compared with infected group (I). ¹ indicates statically differences between the groups. $P<0.05$.

Figure 4 – Effect of systemic NAC in the expression of proinflammatory cytokines in lymphocyte and antigen presenting cells populations from cervical lymphnodes. Proinflammatory cytokine TNF- α (A), IFN- γ (B), and IL-17 (C) expression by total lymphocytes, CD4⁺, CD8⁺ and antigen presenting cells were analyzed by flow cytometry (5 mice/group), as described in material and methods. Groups were: control group (C), NAC treated-non-infected group (N), infected group (I), and infected NAC-treated group (IN). ^{1,2,3} indicates statically differences between the groups where similar numbers represent the compared groups that are different. $P<0.05$

Figure 5 – Effect of systemic NAC in the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in lymphocyte and antigen presenting cells populations from cervical lymphnodes. Percentage (A) and mean intensity of expression (MIF – B) of the modulatory cytokine IL-10 by total lymphocytes, CD4⁺ and antigen presenting cells were analyzed by flow cytometry (5 mice/group), as described in material and methods. Groups were: control group (C), NAC treated-non-infected group (N), infected group (I), and infected NAC-treated group (IN). ^{1,2,3} indicates

statically differences between the groups where similar numbers represent the compared groups that are different. $P < 0.05$

Table 1 – Ratio between IL-10/TNF-alpha

Ratio IL-10/TNF- α . NAC treatment significantly increase the ratio IL-10/TNF- α in infected plus NAC 10mM treatment group (IN) compared to infected group (I) in total lymphocytes, T lymphocytes CD4⁺ cells and antigen presenting cells.

Figure 1

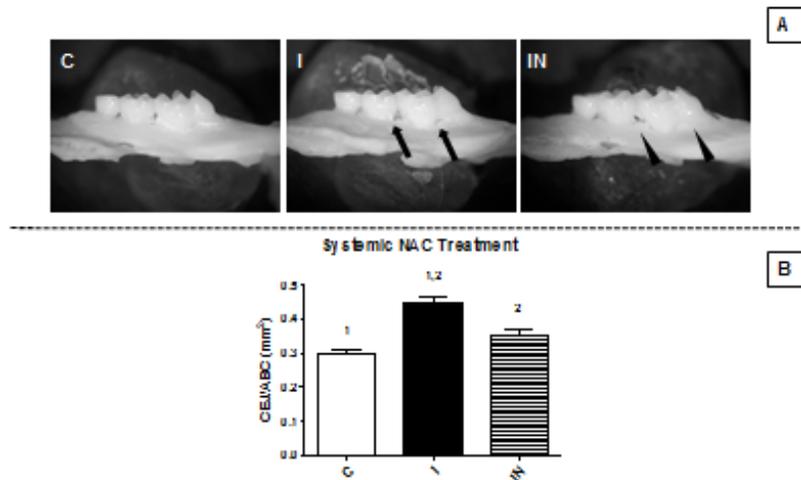
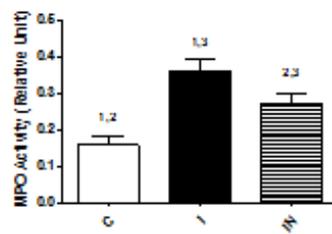


Figure 1 – NAC reduces alveolar bone loss in experimental model of periodontal disease

(a) Representative photographs of maxillae specimens of control group (C), infected group (I), and infected plus NAC 10mM treatment group (IN). I group showed the exacerbation of alveolar bone loss (arrows), however, NAC protected against alveolar bone loss (head arrow).

(b) Morphometric analysis of alveolar bone loss in maxillae. Infected group (I) show significant alveolar bone loss compared to control group (C). NAC treatment protected against alveolar bone loss in infected plus NAC 10mM treatment group (IN). CEJ/ABC (mm²) – Inter cemental-enamel junction/alveolar bone crest area in mm². 1,2 indicates statically differences between the groups, where similar numbers represent the compared groups that are different. $P < 0.05$.

Figure 2

**Figure 2- Systemic NAC decreases MPO activity**

Colorimetric analysis to the local MPO activity in the three different groups (5 mice/group). Infected group (I) show significant increase in MPO activity compared to control group (C). Systemic NAC treatment significantly decrease MPO activity in Infected plus NAC 10mM treatment group (IN) compared with Infected group (I). ^{1,2,3} Indicates statically differences between the groups where similar numbers represent the compared groups that are different. $P < 0.05$.

Figure 3

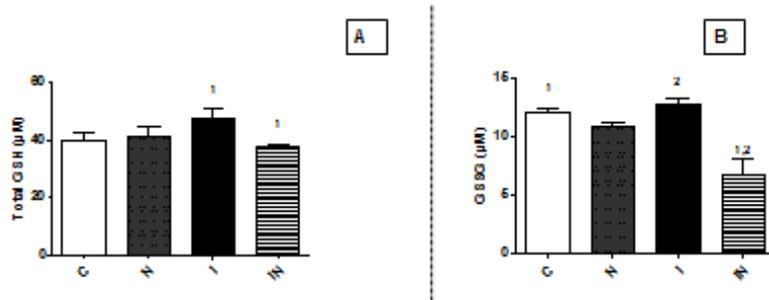


Figure 3- NAC decrease GSSG in peripheral blood

Colorimetric analysis of total GSH (A) and GSSG (B) in peripheral blood of mice submitted to the different treatment (5 mice/group). Infected group (I) show significant increase in total GSH compared with Infected plus NAC 10mM treatment group (IN). Infected plus NAC 10mM treatment group (IN) significantly reduced GSSG compared with Infected group (I). ^{1,2} Indicates statically differences between the groups. *P* < 0.05.

Figure 4

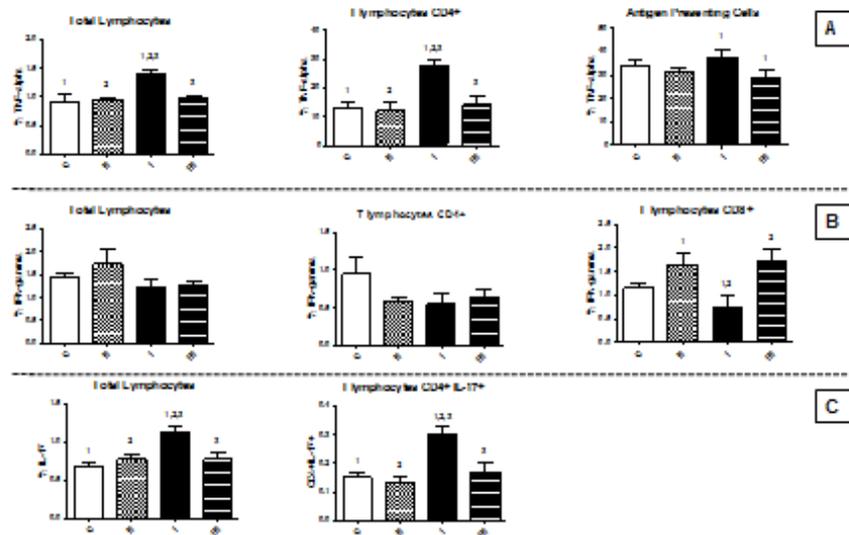


Figure 4 – Effect of systemic NAC in the expression of proinflammatory cytokines in lymphocyte and antigen presenting cells populations from cervical lymph nodes Proinflammatory cytokine TNF- α (A), IFN- γ (B), and IL-17 (C) expression by total lymphocytes, CD4⁺, CD8⁺ and antigen presenting cells were analyzed by flow cytometry (5 mice/group), as described in material and methods. Groups were: control group (C), NAC treated-non-Infected group (N), Infected group (I), and Infected NAC-treated group (IN). ^{1,2,3} Indicates statically differences between the groups where similar numbers represent the compared groups that are different. $P < 0.05$

Figure 5

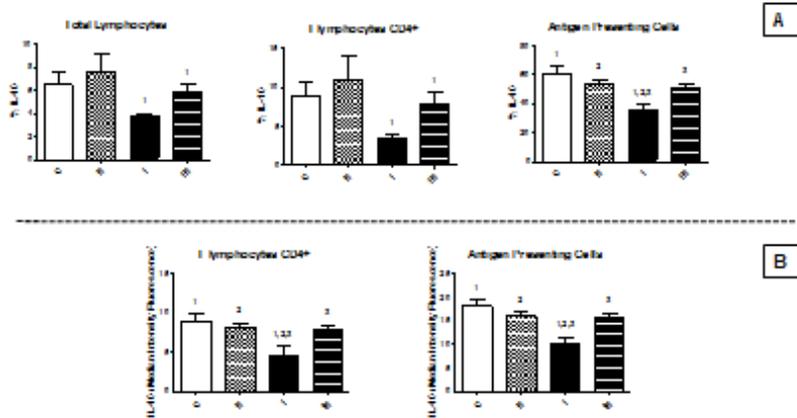


Figure 5 – Effect of systemic NAC in the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in lymphocyte and antigen presenting cells populations from cervical lymphnodes. Percentage (A) and mean intensity of expression (MIF – B) of the modulatory cytokine IL-10 by total lymphocytes, CD4+ and antigen presenting cells were analyzed by flow cytometry (5 mice/group), as described in material and methods. Groups were: control group (C), NAC treated-non-Infected group (N), Infected group (I), and Infected NAC-treated group (IN). ^{1,2,3} indicates statically differences between the groups where similar numbers represent the compared groups that are different. *P*<0.05

Table 1

Total Lymphocytes				
Groups	IL-10 Mean \pm SD	TNF- α Mean \pm SD	Ratio IL-10/TNF- α Mean \pm SD	p
I	3,740,5	1,440,2	2,60 \pm 0,28	0,017
IN	5,841,5	1,040,1	5,67 \pm 1,72	
T Lymphocytes CD4+ cells				
Groups	IL-10 Mean \pm SD	TNF- α Mean \pm SD	Ratio IL-10/TNF- α Mean \pm SD	p
I	3,540,9	26,745,5	0,13 \pm 0,01	0,052
IN	8,145,7	14,245,5	0,65 \pm 0,26	
Antigen Presenting Cells				
Groups	IL-10 Mean \pm SD	TNF- α Mean \pm SD	Ratio IL-10/TNF- α Mean \pm SD	p
I	36,345,1	39,547,5	0,94 \pm 0,35	0,007
IN	50,747,4	29,147,0	1,84 \pm 0,46	

Table 1 – Ratio between IL-10/TNF- α

Ratio IL-10/TNF- α . NAC treatment significantly increase the ratio IL-10/TNF- α in Infected plus NAC 10mM treatment group (IN) compared to Infected group (I) in total lymphocytes, T lymphocytes CD4+ cells and antigen presenting cells.

Anexo III e IV: Artigos publicados: Revista Odonto Ciências e Brazilian Oral Research.