

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Microbiologia

Thales Augusto Anestino

**PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO MURINO E AVALIAÇÃO DO PAPEL  
DO RECEPTOR CCR2 NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL  
INDUZIDA POR *Porphyromonas gingivalis***

Belo Horizonte  
2020

Thales Augusto Anestino

**PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO MURINO E AVALIAÇÃO DO PAPEL DO  
RECEPTOR CCR2 NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL INDUZIDA  
POR *Porphyromonas gingivalis***

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof. Dra. Mila Fernandes Moreira

MadeiraCoorientador: Celso Martins

Queiroz Junior

Belo Horizonte  
2020

043

Anestino, Thales Augusto.

Padronização de um modelo murino e avaliação do papel do receptor CCR2 na doença periodontal experimental induzida por *Porphyromonas gingivalis* [manuscrito] / Thales Augusto Anestino. – 2020.

66 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof. Dra. Mila Fernandes Moreira Madeira. Coorientador: Celso Martins Queiroz Junior.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Doenças Periodontais. 3. *Porphyromonas gingivalis*. 4. Quimiocinas CC. I. Madeira, Mila Fernandes Moreira. II. Queiroz Junior, Celso Martins. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Thales Augusto Anestino  
Nº REGISTRO: 2018685354

Às 09:00 horas do dia 27 de Fevereiro de 2020, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Caio Tavares Fagundes (Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG) e Paula Rocha (Departamento de Morfologia, ICB, UFMG), Profa. Mila Fernandes Moreira Madeira – Orientadora e Dr. Celso Martins Queiroz-Jr- Coorientador, para julgar o trabalho final "Padronização de um modelo murino e avaliação do papel do receptor CCR2 na doença periodontal experimental induzida por *Porphyromonas gingivalis*", do aluno Thales Augusto Anestino, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Dr. Caio Tavares Fagundes

Dra. Paula Rocha

Profa. Mila Fernandes Moreira Madeira [Orientadora]

Dr. Celso Martins Queiroz-Jr [Coorientador]

*Flávio Guimarães da Fonseca*

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca  
Coordenador do PPGM/UFMG

Aos meus queridos e amados avós (Otávio, Ephigênia) e mãe (Juliana), que sempre estiveram ao meu lado me incentivando e proporcionando o melhor para que eu seguisse estudando, buscando me tornar uma pessoa forte e sábia. Muito obrigado por todo suporte, incentivo e amor. Amo vocês para todo o sempre! Aos meus irmãos, Juliele, Otávio Neto, Imara e Taimara pelo companheirismo ao longo dessa jornada. A presença de vocês foi reconfortante e saber que eu posso contar com vocês para buscar a força que preciso pra continuar é algo inexplicável. Amo vocês! Ao meu sobrinho Rodrigo, por ser o grande amor da minha vida. A luz dos meus caminhos e por ser o significado da presença de Deus na minha caminhada. Muito obrigado por me permitir ser seu tio. Te amo muito!

## **Agradecimentos**

A Ornumilá, Oxum e todos os guias espirituais, que estão sempre presentes na minha vida sempre me protegendo, guardando e me guiando pelo melhor caminho com muito amor e sabedoria.

A professora Mila e ao Dr. Celso, pela paciência, suporte e orientação. Pontos essenciais para que eu pudesse superar os desafios diários. Agradeço também pela convivência, a qual foi rica em ensinamentos e aprendizagem, sendo estes importantes fatores para o meu amadurecimento e enriquecimento tanto profissional quanto pessoal. Obrigado por me mostrarem como ser um profissional qualificado e competente. Anseio ser tão bom quanto vocês um dia.

A professora Danielle, que me recebeu com tanto carinho no laboratório, pelos ensinamentos, histórias.

Ao pequeno e grande grupo “Periodontal club”, por cada reunião, cada discussão, cada tarde que passamos juntos enriquecendo e solidificando cada vez mais os nossos conhecimentos. Que este grupo cresça cada vez mais!

Aos meus grandes amigos e companheiros de laboratório, a presença de vocês foi e é indispensável. Obrigado pelas tantas risadas, polêmicas, conselhos e passeios. Vocês são extremamente especiais pra mim. Anna, Amanda, Barbara, Camila, Carla, Carlos, Fran, Gabi, Ian, Jô, Mariana, Matheus, Micheli, Rafael, Rafaela, Thai, Vidy e Victor. Vocês são icônicos! Adoro vocês!

Um agradecimento especial aos meus grandes companheiros de bancada Ian, Mariana, Anna e Amanda, sem vocês eu nem sei o que seria de mim. Vocês foram de grande importância não só para o desenvolvimento desse projeto, mas também para meu crescimento como pessoa e colega de trabalho. Muito obrigado pelo auxílio nos experimentos, pelas risadas tornando os dias de trabalho mais leves. Muito obrigado por tudo!

Aos colegas e professores do grupo Imunofar, obrigado pela constante convivência, no lab e nos momentos de descontração. Obrigado pela ajuda nos diversos momentos durante o desenvolvimento desse projeto. Vocês tornam o ambiente de trabalho/estudo ainda mais interessante e prazeroso.

Aos cristais Gil e Frank por me proporcionarem as melhores manhãs. Obrigado também por sempre estarem dispostas a nos ajudar e pelo imenso carinho e maravilhosa convivência que tivemos ao longo desses dois anos. Vocês são maravilhosas!

As agências de fomento, pelo suporte financeiro.

Aos meus melhores amigos Adrielly, Fabiana, Isabele, Rafaela, Jeferson e Marcos obrigado pela amizade de vocês, pelas alegrias e risadas. Vocês na verdade são meus irmãos de alma, parte da minha família. Amo todos vocês.

Aos familiares por todo carinho e amor. Em especial minhas tias Regina, Luciana e minha prima Larissa por serem mulheres maravilhosas na minha vida e sempre me ajudarem nos momentos mais difíceis me dando amor e apoio. Eu amo muito vocês.

## RESUMO

A doença periodontal (DP) pode ser caracterizada como um processo inflamatório de etiologia infecciosa, que acomete os tecidos de suporte dos dentes. Um dos microrganismos associado à DP é *Porphyromonas gingivalis*, cocobacilo Gram-negativo, anaeróbico obrigatório, residente do biofilme subgingival e classificado como patógeno-chave na DP. Os mecanismos de patogenicidade de *P. gingivalis* promovem disbiose do biofilme subgingival, o que induz uma resposta do hospedeiro com a síntese de mediadores inflamatórios que levam à reabsorção do osso alveolar. Dentre esses mediadores, está o ligante 2 de quimiocina com motivo C-C (CCL2) que, ao interagir com o receptor do tipo 2 para quimiocina C-C (CCR2), aumenta o recrutamento de macrófagos para o sítio da infecção, que podem diferenciar-se em osteoclastos. Assim, o objetivo deste trabalho foi padronizar um modelo experimental murino de DP induzido por *P. gingivalis* e avaliar o papel de CCR2 neste processo. Para isso, camundongos C57Bl/6 foram submetidos a diferentes protocolos de infecção periodontal (antimicrobiano na água de beber, aplicação tópica de gel de clorexidina 0,12% ou ausência de manipulação da microbiota), sendo inoculados com  $10^8$  UFC/mL de *P. gingivalis* na cavidade bucal. Após eutanásia em diferentes tempos experimentais, os tecidos periodontais foram avaliados quanto à perda óssea alveolar, expressão de citocinas e quimiocinas por ELISA, determinação de neutrófilose macrófagos, avaliação histopatológica e imuno-histoquímica para neutrófilos. Para avaliar o papel de CCR2, grupos de camundongos WT e *Ccr2*<sup>-/-</sup> foram inoculados e, após eutanásia em diferentes tempos pós-infecção, os tecidos periodontais e linfonodos cervicais foram avaliados. A infecção com *P. gingivalis* induziu perda óssea alveolar independente do protocolo adotado. Tal perda óssea associou-se ao aumento de IL-6 e número de osteoclastos e diminuição de CXCL-1, neutrófilos e NAG. Os animais *Ccr2*<sup>-/-</sup> infectados apresentaram maior reatividade ao estímulo bacteriano por apresentarem maior índice fagocítico *in vitro* e montagem de resposta na fase aguda da doença, o que gerou maior perda óssea alveolar na fase crônica, associada ao aumento na produção de IL-1 $\beta$ , CCL2 e diminuição de IL-10 em relação aos animais WT infectados. Conclui-se, então, que a infecção com *P. gingivalis* induz reabsorção óssea alveolar associada ao aumento de IL-6 e que CCR2 é importante no remodelamento ósseo associado à DP experimental.

Palavras chave: Doença periodontal. *Porphyromonas gingivalis*. Quimiocinas. CCL2.



## ABSTRACT

Periodontal disease (PD) is an infectious inflammatory process that affects the teeth supporting tissues. One of the microorganisms associated with PD is *Porphyromonas gingivalis*, Gram-negative obligate anaerobic coccobacillus resident in the subgingival biofilm and classified as keystone-pathogen of chronic periodontitis. This bacterium promotes and maintains a dysbiosis of the dental subgingival biofilm. Thus, in response to dysbiosis, inflammatory osteoclastogenic mediators are produced, triggering the resorption of the alveolar bone. Among the inflammatory mediators produced in PD is CC chemokine ligand 2 (CCL2). When interacting with the chemokine type 2 receptor CC (CCR2), CCL2 promotes increased recruitment of macrophages to the site of infection, which may differentiate into osteoclasts. Thus, this study aims to standardize a murine model of PD induced by *P. gingivalis* and to evaluate the role of CCR2 in this process. To that end, mice were submitted to different protocols of periodontal infection (antimicrobial in drinking water, topical application of 0.12% chlorhexidine gel or no manipulation of the microbiota), being inoculated with  $10^8$  CFU / mL of *P. gingivalis* in the oral cavity. After 45 days, mice were euthanized, periodontal tissues were collected and processed for analysis of alveolar bone loss. Subsequently, infection kinetics was performed to assess the inflammatory response. Periodontal tissues were collected and processed for analysis. To evaluate the role of CCR2, groups of WT and *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice were inoculated, and after 30 or 45 days the animals were euthanized, the periodontal tissues were collected and processed for further analysis. WT infected mice showed significant alveolar bone loss regardless adopted protocol. This alveolar bone loss is associated with an increased IL-6, osteoclasts and decreased CXCL-1, neutrophils and NAG production. *Ccr2*<sup>-/-</sup> infected mice showed increased reactivity front the bacterial stimulus to showed a more phagocytic index *in vitro* and response assembly in acute phase to lead a greater alveolar bone loss in chronic phase, associated with an increased IL-1 $\beta$ , CCL2 and decreased IL-10 production when compared to WT infected mice. These results show that infection with *P. gingivalis* induces IL-6-associated bone resorption, as well as pointing out that CCR2 is important in bone remodeling associated with experimental PD.

**Keywords:** Periodontal disease. *Porphyromonas gingivalis*. Chemokines. CCL2.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. <i>P. gingivalis</i> : um patógeno chave ( <i>keystone pathogen</i> ). .....	12
Figura 2. Estrutura de quimiocinas.....	17
Figura 3. Protocolo experimental. ....	24
Figura 4. Quantificação da perda óssea alveolar em camundongos C57BL/6 (WT) .....	30
Figura 5. Quantificação da perda óssea alveolar em camundongos C57BL/6 (WT) .....	31
Figura 6. Avaliação de mediadores inflamatórios em camundongos WT ao longo da infecção e quantificação de MPO e NAG. ....	32
Figura 7. Quantificação de leucócitos no sangue em camundongos WT 45 d.p.i. ....	33
Figura 8. Quantificação da perda óssea alveolar e mediadores inflamatórios em camundongos WT e <i>Ccr2</i> <sup>-/-</sup> 30 e 45 d.p.i. ....	34
Figura 9. Atividade de MPO e NAG em camundongos WT e <i>Ccr2</i> <sup>-/-</sup> 30 e 45 d.p.i. ....	35
Figura 10. Quantificação da perda óssea alveolar em camundongos WT e quantificação de células TRAP positivas, 4 dias após inserção do fio. ....	36
Figura 11. Análise histopatológica e identificação de neutrófilos em camundongos WT, 4 dias após inserção do fio. ....	38
Figura 12. Quantificação de leucócitos no sangue em camundongos WT, 4 dias após inserção do fio. ....	38
Figura 13. Análises histopatológicas de fígado e intestino em camundongos, 4 dias após inserção do fio .....	41
Figura 14. Quantificação da perda óssea alveolar em camundongos WT e <i>Ccr2</i> <sup>-/-</sup> , 4 dias pós-inserção da ligadura .....	42
Figura 15. Atividade de MPO e NAG em camundongos WT e <i>Ccr2</i> <sup>-/-</sup> , 4 dias pós-inserção da ligadura .....	43
Figura 16. Quantificação de microrganismos presentes na ligadura em camundongos WT e <i>Ccr2</i> <sup>-/-</sup> , 4 dias pós-inserção .....	44
Figura 17. Quantificação de leucócitos no sangue e células nos linfonodos cervicais em camundongos WT e <i>Ccr2</i> <sup>-/-</sup> , 4 dias pós-inserção do fio. ....	46
Figura 18. Quantificação de macrófagos fagocíticos e número de bactérias fagocitadas após 1h de estímulo.....	47

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	9
1.1	Biofilme bucal.....	9
1.2	Doença periodontal.....	10
1.3	<i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	12
1.4	Imunopatogênese da DP.....	15
1.5	Ligante 2 de quimiocina com motivo C-C (CCL2) e receptor do tipo 2 para quimiocina C-C (CCR2).....	18
2	Justificativa.....	19
3	Objetivos.....	19
3.2.1	<b>Padronizar o modelo experimental murino de DP induzida por <i>Porphyromonas gingivalis</i>...</b>	19
3.2.2	<b>Avaliar a resposta inflamatória, ao longo do tempo, na DP experimental induzida por <i>Porphyromonas gingivalis</i> em modelo murino.....</b>	20
3.2.3	<b>Analisar o papel de CCR2 na DP experimental induzida por <i>Porphyromonas gingivalis</i>.....</b>	20
3.2.4	<b>Analisar o papel de <i>Porphyromonas gingivalis</i> na perda óssea alveolar induzida por ligadura.....</b>	20
3.2.5	<b>Analisar o papel de CCR2 na perda óssea alveolar induzida por ligadura associada ou não à infecção por <i>Porphyromonas gingivalis</i>.....</b>	20
4	Material e Métodos.....	21
4.2.1	<b>Protocolos de tratamentos prévios a infecção por <i>P. gingivalis</i>.....</b>	22
4.2.2	<b>Protocolo 1: tratamento com antimicrobianos antes da infecção.....</b>	22
4.2.3	<b>Protocolo 2: tratamento local com clorexidina antes da infecção.....</b>	22
4.2.4	<b>Protocolo 3: ausência de tratamento prévio antes da infecção.....</b>	22
4.5	Medida da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	25
4.6	Medida da atividade da enzima N-acetil-β-D-glucosaminidase (NAG).....	26
4.7	Análises histológicas.....	26
4.8	Imuno-histoquímica para neutrófilos.....	27
4.9	Avaliação da perda óssea alveolar.....	28
4.10	Citometria de fluxo de linfonodo cervicais.....	28
4.11	Determinação do índice fagocítico.....	28
4.12	Avaliação de mediadores inflamatórios produzidos por macrófagos murinos.....	29
4.13	Análises estatísticas.....	29
5	Resultados.....	29
6	Discussão.....	47
7	Considerações finais.....	51
	Referências.....	52

## 1 Introdução

### 1.1 Biofilme bucal

O conjunto de microrganismos comensais determina e compõe a microbiota humana (XU, WANG, ZHANG, 2015). Essa microbiota está presente em diversos sítios, como a pele, o trato gastrointestinal e a cavidade bucal (HE, LI, XUE, ZHOU, 2015), em uma relação de simbiose com o hospedeiro. A microbiota humana está envolvida em diversos processos, como a modulação imunológica e manutenção da saúde, podendo também induzir processos inflamatórios (ZHAO et al., 2017; TURNBAUGH et al., 2007). A microbiota bucal, por exemplo, é essencial para manutenção da fisiologia do ecossistema bucal e,consequentemente, para a saúde do hospedeiro. Contudo, essa microbiota também está envolvida no desenvolvimento de doenças bucais, como cárie e doença periodontal (DP) (CHO, T. et al., 2014; MAGER et al. , 2003).

A microbiota bucal é composta por bactérias, fungos, vírus e *Archeae*, organizados em biofilme. O biofilme bucal é definido como uma comunidade microbiana dinâmica e complexa, que apresenta uma relação comensal com o hospedeiro (WADE, 2012). O biofilme bucal encontra-se em diferentes sítios, como as superfícies dos dentes, gengiva, sulco gengival e língua. São sítios característicos da cavidade bucal e que a difere de outros locais do organismo (COSTALONGA, 2015). Esse biofilme pode ser classificado quanto à sua localização em supragengival ou subgengival (CHANDKI; BANTHIA; BANTHIA, 2011). O biofilme subgengival apresenta, em sua composição, bacilos Gram-negativos, anaeróbios obrigatórios que estão relacionados com DP, como *Tanarella forsythia*, *Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivalis*, entre outros. (MARSH, 2004; HAFFAJEE et al., 2008). Na cavidade bucal já foram identificadas mais de 700 espécies bacterianas distribuídas por diversos sítios (LIF HOLGERSON et al., 2015; DEWHIRST et al., 2010). Dentre as espécies identificadas, a maior parte está no grupo das espécies cultiváveis como os componentes dos gêneros *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema*, *Nisseria*, *Haemophilus*, *Johnsonella*, *Mogibacterium*, *Suttonella*, *Jonquetella*, *Pyramidobacter*, *Lactobacillus*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*, *Propionibacterium*, *Saccharibacteria*, *Gracilibacteria*, *Scardovia*, *Megasphaera*, *Olsenella*, dentre outros (AVILA; OJCIUS; YILMAZ, 2009; LIF HOLGERSON, et al. 2015; DEO; DESHMUKH, 2019). *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T.*

*denticola* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* são microrganismos colonizadores secundários. Entretanto, existem trabalhos que discutem a possibilidade de *A. actinomycetemcomitans* ser um colonizador primário, tendo potencial para iniciar a sucessão ecológica do biofilme bucal (FINE et al., 2010; FINE; PATIL; VELUSAMY, 2019) por meio da interação de estruturas, como fimbrias, lipopolissacarídeos e invasinas caracterizando o processo de coadesão (KUBONIWA; LAMONT, 2010). Além de bactérias há presença de fungos, como os do gênero *Candida* (JIA et al., 2018; ARWEILER; NETUSCHIL, 2016; AVILA; OJCIUS; YILMAZ, 2009). O biofilme dental é composto, em sua maior parte, por uma matriz constituída por polissacarídeos ou substância polimérica extracelular (EPS), lipídeos, DNA extracelular e proteínas (FLEMING; RUMBAUGH, 2017). Esta complexa estrutura microbiana é uma importante forma de resistência à ação do sistema imune e a drogas antimicrobianas, sendo associada a processos patológicos, como a DP (STEWART; COSTERTON, 2001).

Na complexa arquitetura do biofilme bucal é possível observar microrganismos: a) comensais, que exercem papel imunomodulador importante para manutenção da homeostase na relação microbiota-hospedeiro (DEVINE; MARSH; MEADE, 2015); b) mutualísticoscapazes de interagir com outros microrganismos em relação ambigualmente positiva formando uma complexa comunidade como, por exemplo, *A. actinomycetemcomitans* que interage com *Fusobacterium nucleatum* e *Veillonella* spp, formando biofilme *in vitro* (PERIASAMY; KOLENBRANDER, 2009) e c) patobiontes, que são microrganismos que exercem um papel patogênico frente a condições que causam alterações na relação homeostática existente entre a microbiota e o hospedeiro, como por exemplo, na disbiose (HAJISHENGALLIS, 2014). A disbiose é caracterizada como a ruptura da relação de equilíbrio entre hospedeiro-microbiota, caracterizada por uma alteração na composição do biofilme bucal, podendo haver mudanças na abundância de componentes microbianos. Dessa forma, observa-se um perfil distinto do biofilme em homeostase, relacionado ao periodonto saudável. O biofilme bucal disbiótico pode desencadear um processo inflamatório e, assim, correlacionar-se com a natureza infecciosa e inflamatória da DP (HAJISHENGALLIS, 2012; MARTIN et al., 2017).

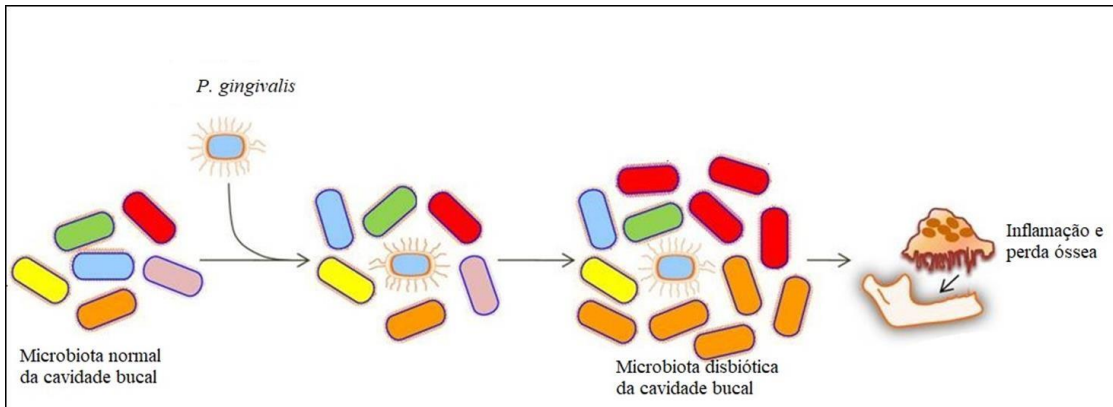
## **1.2 Doença periodontal**

A DP caracteriza-se como um processo inflamatório de etiologia infecciosa que acomete os tecidos de suporte dos dentes, com diferentes graus de gravidade, podendo gerar a destruição de tecidos periodontais como o ligamento periodontal e o osso alveolar (DE

PABLO et al., 2009). A gengivite e a periodontite são manifestações clínicas de DP (BOTERO et al., 2015). A gengivite afeta apenas os tecidos moles de suporte e é de caráter reversível (KHAN et al., 2015). A periodontite é caracterizada pela destruição dos tecidos de suporte dentário, incluindo o osso alveolar. A reabsorção óssea horizontal observada na periodontite é irreversível e pode levar à instabilidade e posterior perda do elemento dental (PAPAPANOU; SUSIN, 2017). Nem sempre a gengivite progride para um quadro de periodontite; porém um quadro de periodontite pode ser precedido por gengivite (OH; EBER; WANG, 2008).

Em 2014 um estudo mostrou que 5 a 20% da população mundial apresentava periodontite, afetando majoritariamente adultos (KASSEBAUM, 2014). Contudo, em 2017 outro estudo afirmou que 20 a 50% da população mundial é afetada por DP. A prevalência de cálculo e sangramento no periodonto da população jovem foi de 35% a 70% (NAZIR, 2017). Na população adulta, a prevalência encontrada de cálculo e sangramento no periodonto foi de 14 - 47%, mas com alguns indivíduos apresentando bolsas periodontais, principalmente na população de países em desenvolvimento. Na América Latina, um estudo relatou uma prevalência de cerca de 20,4% de DP em 2010 (FRENCKEN et al., 2017). No Brasil, em 2010, a região Norte do país apresentou os piores parâmetros de saúde periodontal: 58,4% das crianças apresentaram DP. Além disso, em pessoas entre 15-19 anos, apenas 30,8% apresentaram periodonto saudável e dentre os idosos, apenas 1% apresentaram periodonto saudável (PALMA; LEITE, 2014).

As espécies bacterianas isoladas com frequência em processos inflamatórios na DP são Gram-negativas, proteolíticas e anaeróbias obrigatórias, como *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. gingivalis* e *T. forsythia* (TSUCHIDA et al., 2017; IWAI, 2009; TEZAL et al., 2006). Algumas dessas bactérias podem ser classificadas como “patógeno chave” ou “*keystone pathogen*”, ou seja, microrganismos que residem em um determinado sítio, em pequenas concentrações, porém são capazes de iniciar processos inflamatórios, independente de um aumento populacional, determinando um quadro patológico. Um exemplo relevante de *keystone pathogen* no contexto da DP é *P. gingivalis* (HAJISHENGALLIS, 2014), pois mesmo residindo em pequenas proporções no biofilme subgengival, é capaz de promover o início e a progressão da DP (Figura 1) (HOW; SONG; CHAN, 2016).



**Figura 1. *P. gingivalis*: um patógeno chave (keystone pathogen).** *P. gingivalis* está relacionada à periodontite, possuindo diversos mecanismos de patogenicidade que induzem e mantêm uma disbiose no biofilme subgingival, ou seja, um desequilíbrio da abundância relativa de componentes individuais da microbiota subgingival em comparação com suas abundâncias na saúde periodontal. A capacidade de *P. gingivalis* de conduzir a doença inflamatória com efeitos em toda a comunidade, embora seja um constituinte minoritário desta comunidade, qualifica-a como um patógeno-chave. Fonte: Adaptado de: HAJISHENGALLIS; DARVEAU; CURTIS, 2016.

### 1.3 *Porphyromonas gingivalis*

*P. gingivalis* é um cocobacilo Gram-negativo, anaeróbio obrigatório, proteolítico, imóvel, que pode estar presente no biofilme subgingival. *P. gingivalis* possui diversos fatores de patogenicidade que permitem a colonização, invasão de tecidos, subversão de respostas do hospedeiro e degradação dos tecidos periodontais (HOW; SONG; CHAN, 2016; BODET; CHANDAD; GRENIER, 2007; SOCRANSKY et al., 1998).

A colonização bucal por *P. gingivalis* é favorecida, por exemplo, pela coadesão a *Streptococcus gordonii*, mediada por interações entre as fímbrias e adesinas de *P. gingivalis* a proteínas de superfície de *S. gordonii* (LAMONT; HAJISHENGALLIS, 2015). Além do mais, *P. gingivalis* apresenta uma relação intimamente nutricional com *T. denticola*, uma vez que *T. denticola* produz ácido succínico, que auxilia na multiplicação de *P. gingivalis*. Esta, por sua vez, produz ácido isobutírico, que estimula o desenvolvimento de *T. denticola*, apresentando caráter sinérgico em modelos murinos de DP (HAJISHENGALLIS; LAMONT, 2016). Além das interações com outras células bacterianas, há também interação por meio de adesina da levedura *Candida albicans*, que também é um colonizador do biofilme dental (SZTUKOWSKA et al., 2018).

Os principais fatores de patogenicidade apresentados por *P. gingivalis* são: gingipaínas, Serina B (SerB) (HASEGAWA, Y. et al., 2008), fímbrias, lipopolissacarídeo (LPS), polissacarídeos capsulares (LAHEIJ et al., 2015; DASHPER et al., 2017), vesículas de

membrana externa (NAKAYAMA; OHARA, 2017), sialidase (STAFFORD; ROY; HONMA; SHARMA, 2012) e hemolisina (HOLT et al., 1999):

As gingipaínas são proteinases produzidas por *P. gingivalis*, que incluem as proteinases arginina específicas (RgpA e RgpB) e proteinase lisina específica (KgP), que auxiliam na captação de hemoglobina, ferro e ferritina. Além disso, estão envolvidas na indução da produção de IL-1 $\beta$  e do ligante do receptor do ativador do fator nuclear  $\kappa$ -B (RANKL). Atuam também no sinergismo da *P. gingivalis* com outros anaeróbios do biofilme subgingival, como o *T. denticola* e na degradação de peptídeos antimicrobianos, como as defensinas produzidas por neutrófilos e as proteínas do sistema do complemento: C3, C4 e C5 (BAO et al., 2014). Há também a promoção de um *crosstalk* entre C5aR e o receptor do tipo Toll 2 (TLR2), gerando a degradação da proteína adaptadora conhecida como fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88) e proporcionando a diminuição de neutrófilos capazes de realizar o *clearance* desta bactéria (MAEKAWA et al., 2014). Além de promoverem a degradação e inativação de imunoglobulinas (IgG e IgA), essas proteases também são capazes de promover sangramento por meio da degradação de fibrinogênio (KADOWAKI et al., 2000).

SerB é uma invasina importante para a sobrevivência intracelular deste microrganismo (TRIBBLE, G.D. et al. 2006). É sabido que esta enzima, pertencente à família haloácido desalogenase (HAD), satisfaz o caráter subversivo deste microrganismo por desfosforilar a subunidade p65, suprimindo ativação de NF- $\kappa$ B e a secreção de IL-8 (TAKEUCHI, H. et al., 2013). A IL-8/CXCL8 bem como a quimiocina CXCL1 atuam na quimiotaxia de neutrófilos (PALOMINO; MARTI 2015), células importantes para o controle da infecção e manutenção da homeostase dos tecidos periodontais (SOCHALSKA, M.; POTEMPA, J., 2017).

As fímbrias bacterianas são estruturas de superfície responsáveis por promover adesão aos tecidos do hospedeiro, a bactérias presentes no biofilme subgingival, a moléculas salivares e à matriz extracelular de células epiteliais. *P. gingivalis* possui dois tipos de fímbrias envolvidas na invasão e colonização, as fímbrias FimA e as fímbrias Mfa que têm atividade pró-inflamatória (YILMAZ; WATANABE; LAMONT, 2002; DASHPER et al., 2017), induzindo a expressão de NF $\kappa$ B, Ciclo-oxigenase-2 (COX-2), produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF e IL-6 (HAJISHENGALLIS; GENCO, 2004; MURAKAMI; MACHINO; FUJISAWA, 2012; JOTWANI; CUTLER, 2004). TNF regula outras citocinas



inflamatórias, como IL-6, levando a um intenso infiltrado celular causando degradação óssea (TAYLOR, P. C.; WILLIAMS, R. O.; FELDMANN, M., 2004; ELKADI et al. 2018).

Estudos experimentais, como o desenvolvido por Brunner et al. (2010) apontam o quanto a cápsula é um importante fator de patogenicidade em infecções, apresentando muitas funções na virulência de *P. gingivalis*. A cápsula bacteriana propicia a evasão da resposta imune do hospedeiro por promover alteração na expressão de fatores de transcrição e produção de citocinas, redução da fagocitose e aumento da sobrevivência da bactéria (SINGH et al., 2011). Sabe-se que há variações quanto ao sorotipo capsular (K1-K6), com diferentes vias de adesão, sendo o sorotipo K4 o de maior adesão às células humanas (VERNAL et al., 2009). O caráter imunogênico da cápsula de *P. gingivalis* induz produção de IgG (BOSTANCI; BELIBASAKIS, 2012).

O LPS, componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas, é também um importante fator de patogenicidade de *P. gingivalis*, envolvido na patogênese da DP (HERATH et al., 2016). A resposta ao LPS induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) por meio dos receptores do tipo *Toll*-4 (TLR4), TLR2 e por NF- $\kappa$ B (ZHANG et al., 2008). Além de citocinas pró- inflamatórias, o LPS desta bactéria, *in vitro*, é capaz de promover aumento da produção da quimiocina CCL2 por células epiteliais de lesões bucais de líquen plano (ZENG et al., 2018). Além disso, *P. gingivalis* apresenta a habilidade de alterar a conformação do lipídio A de seu LPS, antagonizando a ativação por TLR4, por meio da ação da fosfatase de lipídeo A, que é regulada pela fase de crescimento e fatores ambientais, como temperatura e disponibilidade de heme (HAJISHENGALLIS, 2015). Logo, *P. gingivalis* é capaz de usar fatores de patogenicidade distintos para modulação da resposta imune, em condições microambientais diferentes (DARVEAU, 2009).

As vesículas de membrana externa (*outer membrane proteins* – OMPs) de *P. gingivalis*, após serem produzidas e posteriormente internalizadas pela célula hospedeira por meio de endocitose, são capazes de induzir a destruição dos tecidos periodontais por proteólise (NAKAO et al., 2014), uma vez que apresentam concentrado de gingipaínas (RagA, RagB, Kgp) em sua composição (IMAI et al., 2005). Outra função de OMPs de *P. gingivalis* está relacionada à nutrição bacteriana por promover a degradação de hemoglobina para aquisição de heme e peptídeos (VEITH et al., 2014).

Sialidase (neuraminidase) e as sialoglicoproteases clivam proteínas gerando peptídeos e satisfazendo características proteolíticas de *P. gingivalis*, além de expor receptores para promoção da interação do microrganismo com o hospedeiro (ARUNI et al., 2011). Hemolisinas são enzimas que lisam eritrócitos para aquisição de heme, molécula de grande importância para *P. gingivalis* e que interfere até mesmo na morfologia deste microrganismo (SMALLEY; OLCZAK, 2017).

Em resumo, todas essas moléculas produzidas por *P. gingivalis* desempenham um papel importante na patogênese da DP. Elas agem na resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro, promovendo a subversão leucocitária, determinando a disbiose do biofilme subgengival e gerando uma resposta inflamatória. Isso, então, culmina na lesão tecidual observada na DP (HAJISHENGALLIS et al., 2013; CARVALHO-FILHO et al., 2016).

#### **1.4 Imunopatogênese da DP**

No processo inflamatório da DP, que envolve uma microbiota bucal disbiótica (BELIBASAKIS; REDDI; BOSTANCI, 2010), os componentes bacterianos, como o LPS e peptideoglicano, são reconhecidos pelos receptores TLR4 e TLR2, respectivamente, que são expressos em células presentes e/ou recrutados para os tecidos periodontais, como células epiteliais, fibroblastos, macrófagos e/ou monócitos, células dendríticas e neutrófilos (DIXON; BAINBRIDGE; DARVEAU, 2004; TAKEDA; AKIRA, 2004; BURNS et al., 2006). Ao contrário da maioria dos microrganismos Gram-negativos, o LPS de *P. gingivalis* é reconhecido e interage tanto com TLR4 quanto com TLR2 (DARVEOU et al., 2004). Contudo, esta propriedade de dupla ativação é controversa, pois o método de purificação do LPS interfere na ativação destes receptores, uma vez que este microrganismo pode apresentar alterações no lipídeo A e os métodos utilizados podem ainda manter o LPS com lipoproteínas (NATIVEL et al., 2017).

O reconhecimento de padrões associados a microrganismos (MAMPS) promove a liberação de citocinas e quimiocinas por células presentes na região periodontal, como os macrófagos e neutrófilos, recrutando e ativando outras células (CEKICI, A. et al., 2014). Os neutrófilos, principal componente da primeira linha de defesa contra patógenos invasores, são encontrados também na homeostase tecidual. Contudo, na DP, os neutrófilos são uma das principais células presentes no infiltrado celular e sintetizam altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (ROS) e “armadilhas” extracelulares (NET), na tentativa de controlar a disbiose subgengival, o que resulta também em lesão tecidual (FINE et al., 2016). Quando

estimulados *in vitro* por LPS de *P. gingivalis*, a resposta mediada por neutrófilo é seguida da expressão de metaloproteinase-9 (MMP9) e IL-8, esta citocina também é conhecida como um membro da família de quimiocinas CXC (CXCL-8), proteína atuante na quimiotaxia de neutrófilos (PALOMINO; MARTI 2015). Na DP associada a *P. gingivalis* há a desregulação da expressão de E-selectina e da produção de IL-8, promovendo alteração no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório (SILVA et al., 2015). Além disso, neutrófilos estimulados por MAMPs, *in vitro*, expressam RANKL de membrana, estimulando a osteoclastogênese por interação com os pré-osteoclastos, induzindo a diferenciação em osteoclastos e determinando a reabsorção óssea (CHAKRAVARTI, et al., 2008).

Durante a patogênese da DP, há também a presença de células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas que estimulam linfócitos CD4 Th0 (*naïve*), residentes da região periodontal, a diferenciarem em Th1, Th2, Th17 ou Treg, dependendo do tipo de citocinas presentes em altos níveis no sítio inflamatório: os linfócitos Th1 estimulam uma resposta celular na presença de interleucina 12 (IL-12), linfócitos Th2 estimulam a resposta humoral na presença de IL-4, Th17 estimulam a osteoclastogênese na presença de fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), IL-1 $\beta$  e de IL-6, ao passo que linfócitos Treg sintetizam a interleucina anti- inflamatória IL-10 além de TGF- $\beta$ , que inibem a síntese de citocinas inflamatórias por polimorfonucleares (PMN) e macrófagos (YUCEL-LINDBERG; BAGE, 2013).

Células Th1 secretam IL-2, TNF e IFN- $\gamma$  (SAITO et al., 2010) que atua na regulação e proliferação de células T e IL-6, que é uma potente indutora da osteoclastogênese, além de ser secretada por outros tipos celulares, como fibroblastos, células mononucleares e células do ligamento periodontal. Células Th17 secretam a citocina IL-17, que além de induzir a diferenciação de pré-osteoclastos a osteoclastos (OCLs) também está relacionada ao recrutamento de neutrófilos para o sítio de inflamação. Além disso, IL-17 estimula a síntese de IL-1 $\beta$ , uma citocina importante na indução da osteoclastogênese por induzir a expressão de RANKL por algumas células residentes, como os fibroblastos do ligamento periodontal. Essas citocinas estão relacionadas ao processo de osteoclastogênese observado na DP, o que conseqüentemente promove a perda óssea alveolar (YUCEL-LINDBERG; BAGE, 2013; TSUKASAKI et al., 2018).

A perda óssea alveolar pode ser determinada pelo aumento da produção de RANKL, que liga-se ao receptor RANK presente em pré-osteoclastos, promovendo, desse modo, a diferenciação em OCLs, células que são responsáveis pela reabsorção óssea. A ação exacerbada desse ligante promove o desequilíbrio das funções de OCLs e osteoblastos

(OBLs), células responsáveis pela síntese da matriz óssea. A osteoprotegerina (OPG) é um receptor *decoy* responsável pela inibição da ligação de RANKL ao RANK, participando da manutenção da homeostase óssea (SILVA; BRANCO, 2011). Assim, um desequilíbrio nestas moléculas pode caracterizar uma atividade patológica, que muitas vezes é mediada por citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF que induzem a osteoclastogênese por estimulação da expressão de RANKL (BOYCE et al., 2003). Citocinas, como IFN- $\gamma$  e IL-4 são estimuladoras de OPG, sendo assim, determinam a inibição da ação do RANKL (TAKAYANAGI, 2005). Entretanto, já foi demonstrado que IFN- $\gamma$  pode também atuar como indutor de perda óssea ao induzir o aumento de leucócitos, associado ao aumento de mediadores, como TNF, CCL-5, CXCL-3, CXCL-10 e, conseqüente, um aumento da expressão de RANKL nos tecidos periodontais (GARLET et al., 2008).

Na região periodontal há também a ação de quimiocinas que são essenciais ao recrutamento de células que atuam no controle da microbiota bucal (GRDOVIĆ et al., 2016; GREER et al., 2016). As quimiocinas são divididas em 4 subfamílias de acordo com a posição do resíduo conservado de cisteína na estrutura de polipeptídeo: C, CC, CXC e CX3C em que as subfamílias CC e CXC parecem exercer papel principal no contexto inflamatório da doença periodontal (SAHINGUR; YEDUALL, 2015) (Figura. 2).



**Figura 2. Estrutura de quimiocinas.** Esquema indicando as relações entre resíduos de cisteína conservados (C), juntamente com pontes de dissulfetos intracadeias. As classes C, CC, CXC e CX3C- de quimiocinas são representadas. Fonte: Adaptado de: SAHINGUR; YEUDALL, 2015.

As quimiocinas CC (quimiocinas  $\beta$ ) atuam principalmente na quimiotaxia de monócitos e quimiocinas CXC (quimiocinas  $\alpha$ ), atuam na quimiotaxia de neutrófilos (PALOMINO ; MARTI, 2015).

As quimiocinas são produzidas por uma gama de células, como fibroblastos, osteoclastos, macrófagos, células epiteliais, mastócitos, linfócitos e monócitos. São responsáveis pelo recrutamento de células inflamatórias e agem a partir da sua interação com receptores (A. KAYAL, 2013). A quimiocina ligante 2 de quimiocina com motivo C-C (CCL2) destaca-se dentre as quimiocinas presentes no sítio inflamatório da DP, com observações *in vitro* e *in vivo* que corroboram o seu papel no recrutamento de leucócitos para

o sítio periodontal (FITZSIMMONS; GE; BARTOLD, 2018; STADLER et al., 2016; GREER et al., 2016; SOUTO; QUEIROZ-JUNIOR; COSTA; MESQUITA, 2014)

### **1.5 Ligante 2 de quimiocina com motivo C-C (CCL2) e receptor do tipo 2 para quimiocina C-C (CCR2)**

A quimiocina CCL2 tem papel chave na quimiotaxia de monócitos, macrófagos, linfócitos T e células NK para um sítio de inflamação (DESHMANE et al., 2009). CCL2 é produzida por células dendríticas, macrófagos, neutrófilos e, quando presente em altas concentrações, propicia a geração de ROS (PALOMINO; MARTI, 2015). *In vitro*, Damgaard et al. (2017) demonstraram que neutrófilos de pacientes com DP, desafiados com LPS de *P. gingivalis*, produziram CCL2 e ROS em altas concentrações. Além disto, CHOI et al. (2009) demonstraram, *in vitro*, que *P. gingivalis* possui maior potencial para indução da síntese de CCL2 em células endoteliais - *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVEC) - em comparação a outros periodontopatógenos, como *T. denticola*.

Durante processos inflamatórios ósseos, CCL2 é sintetizada por osteoblastos, promovendo o recrutamento de monócitos ao sítio (SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2017). Citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF e IFN- $\gamma$  induzem a síntese de CCL2 (VOLEJNIKOVA et al., 1997). Já foi demonstrado que CCL2 interage com o receptor CCR2, presente em pré-osteoclastos, induzindo a diferenciação em osteoclastos, culminando na perda óssea alveolar (GOTO et al., 2011). Além disso, a interação entre RANK e RANKL medeia a expressão de CCR2 em osteoclastos e também a síntese de CCL2 (KIM; DAY; MORRISON, 2005). A quimiocina CCL2, juntamente com outras quimiocinas e proteínas granulares, permeiam a interação entre neutrófilos e macrófagos, uma vez que a produção de CCL2 por neutrófilos é importante para o influxo de macrófagos. Além disso, a resposta inflamatória mediada por células Th17 via receptor 2 de quimiocina C-C (CCR2), induz a produção de IL-17 e, conseqüentemente, de maneira indireta, atua na resposta neutrofílica (HAJISHENGALLIS et al. , 2015).

O receptor CCR2 é expresso em monócitos, linfócitos, basófilos e células dendríticas em condições fisiológicas (VAN COILLIE; DAMME; OPDENAKKER, 1999). Contudo, neutrófilos ativados podem expressar CCR2, perdendo a capacidade responsiva a estímulos realizados por quimiocinas do tipo CXC e passam a responder a estímulos gerados por quimiocinas do tipo CC, desempenhando um importante papel no contexto inflamatório (TALBOT et al. , 2015). CCR2 possui a capacidade de ligação a CCL2 e a outras 4

quimiocinas: CCL7, CCL8, CCL12 e CCL3. Contudo, quando CCL2 liga-se a CCR2, a quimiotaxia de monócitos é aumentada (BOSE; CHO, 2013). Um estudo desenvolvido por BARROS et al. (2011) demonstrou que o antagonismo local de CCR2 promoveu redução da perda óssea alveolar em modelo murino de DP induzida por *P. gingivalis*, utilizando camundongos BALB/c. Entretanto, sua atuação no contexto inflamatório da DP não está bem esclarecida.

## **2 Justificativa**

O estudo do receptor CCR2 em modelo murino de DP induzida por *P. gingivalis* ainda é pouco explorado. A maior parte dos estudos disponíveis na literatura foi feita *in vitro* e demonstra que *P. gingivalis* é capaz de induzir a síntese de CCL2 por células HUVEC em cultura, quando comparado a outros periodontopatógenos. *P. gingivalis* é um importante microrganismo, conhecido como “patógeno chave”, capaz de subverter o sistema imunológico a fim de manter a disbiose do biofilme bucal, alimentando o processo de ativação osteoclastogênico. O eixo CCL2/CCR2 é importante no processo que determina a perda óssea alveolar por estar relacionado à quimiotáxia de células precursoras de osteoclastos para o sítio inflamatório auxiliando no aumento da degradação da matriz óssea e induzindo o estado de reabsorção óssea patológica. Neste contexto, há uma necessidade de se investigar este eixo como possível novo alvo terapêutico para o tratamento da DP.

## **3 Objetivos**

### **3.1 Objetivo geral**

Padronizar modelo experimental de DP induzida por *P. Gingivalis* em camundongos e avaliar o papel de CCR2.

### **3.2 Objetivos específicos e estratégias experimentais**

#### **3.2.1 Padronizar o modelo experimental murino de DP induzida por *Porphyromonas gingivalis***

Padronizar um modelo de DP em camundongos C57BL/6 (WT) pela inoculação bucal de *P. Gingivalis* ATCC 33277 utilizando diferentes protocolos de tratamento previamente à inoculação bucal:

- a) Tratamento prévio com antimicrobiano na água de beber (BAKER et al.,1994);
- b) Tratamento prévio com aplicação tópica de gel de clorexidina 0,12%/carboximetilcelulose (CMC) 2% na cavidade bucal, 24 horas antes da inoculação (LIN et al., 2017);
- c) Ausência de manipulação da microbiota bucal previamente à inoculação (MCINTOSH; HAJISHENGALLIS,2013).

Em todos os protocolos utilizados foi avaliada a perda óssea alveolar (pela medida da área entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) na face palatina do primeiro molar superior).

### **3.2.2 Avaliar a resposta inflamatória, ao longo do tempo, na DP experimental induzida por *Porphyromonas gingivalis* em modelo murino**

Indução de DP em camundongos C57BL/6 de acordo com o protocolo padronizado e avaliação da cinética de inflamação (MPO, NAG e ELISA) no sítio periodontal nos tempos de 3, 15, 30 e 45 dias após a inoculação inicial.

### **3.2.3 Analisar o papel de CCR2 na DP experimental induzida por *Porphyromonas gingivalis*.**

Indução de DP em camundongos C57BL/6 (WT) ou deficientes para CCR2 (*Ccr2*<sup>-/-</sup>), avaliando a perda óssea alveolar e a resposta inflamatória periodontal (MPO, NAG e ELISA).

### **3.2.4 Analisar o papel de *Porphyromonas gingivalis* na perda óssea alveolar induzida por ligadura.**

Inserção de ligadura em camundongos C57BL/6 utilizando protocolo previamente padronizado (ABE; HAJISHENGALLIS, 2013), associado à infecção por *P. Gingivalis* e avaliação da perda óssea alveolar, mediadores inflamatórios (ELISA), marcação de neutrófilos (imunohistoquímica), análises histopatológicas da maxila (HE), osteoclastogênese (TRAP) no sítio periodontal e alterações sistêmicas (contagem total e diferencial de células, análises histopatológicas em sítios extra bucais), 4 dias após a inserção da ligadura.

### **3.2.5 Analisar o papel de CCR2 na perda óssea alveolar induzida por ligadura associada ou não à infecção por *Porphyromonas gingivalis*.**

Indução de reabsorção óssea alveolar em camundongos C57BL/6 (WT) ou deficientes para CCR2 (*Ccr2*<sup>-/-</sup>), utilizando protocolo de ligadura associado à infecção por *P. gingivalis* e

avaliação da perda óssea alveolar, mediadores inflamatórios (ELISA), marcação de neutrófilos (imunohistoquímica) no sítio periodontal, avaliação da microbiota bacteriana da ligadura (cultivo), alterações sistêmicas (contagem total e diferencial de células e citometria de fluxo em linfonodos cervicais), 4 dias após a inserção da ligadura.

## 4 Material e Métodos

### 4.1 Camundongos

Para os experimentos de indução de DP foram utilizados grupos de camundongos C57BL/6j *wild type* (WT) e camundongos deficientes para o receptor CCR2 (*Ccr2*<sup>-/-</sup>), machos, com idade entre 6 a 8 semanas, em grupos com n = 5 ou 8. Os camundongos WT foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), enquanto os camundongos *Ccr2*<sup>-/-</sup> foram fornecidos pelo laboratório de Imunofarmacologia da UFMG. Ambos foram mantidos em condições adequadas, com ciclo claro-escuro de 12 horas e com livre acesso à água e ração. Contudo, ao longo do experimento, especificamente nos dias de indução de doença periodontal, os camundongos passaram por período de privação de acesso à água por 30 minutos e à ração por 4 horas, previsto metodologicamente. Todos os experimentos foram feitos dentro das normas do Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEUA) da UFMG conforme protocolo aprovado sob o nº 34/2019.

### 4.2 Microrganismo

Uma amostra de *P. gingivalis* ATCC 33277 foi cultivada em ágar BHI sangue (infusão de cérebro e coração, com 5% de sangue de carneiro) suplementado com 1 mg/mL de hemina e 5 mg/mL de menadiona. O tempo de crescimento foi de 7 dias, a 37°C, em atmosfera de anaerobiose, utilizando-se a câmara de anaerobiose do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, do Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG. Para o armazenamento, *P. gingivalis* ATCC 33277 foi mantida a -80°C, em alíquotas de 1,5 mL de meio de criopreservação, contendo 20% de glicerol.

Após 7 dias em meio BHI sólido suplementado com hemina, menadiona e sangue de carneiro e 48 horas em meio BHI caldo acrescido com hemina e menadiona, as amostras foram centrifugadas (5000 rpm/750g por 7 minutos a 25°C) e o sedimento suspenso em PBS para obtenção da suspensão com absorbância correspondente a  $1 \times 10^9$  UFC/mL, utilizando OD de 600 nm. Foram adicionados 1,5% de carboximetilcelulose (CMC) à solução para que o



líquido inoculado obtivesse um aspecto viscoso, facilitando a permanência e consequente colonização da bactéria na cavidade bucal.

#### **4.2.1 Protocolos de tratamentos prévios a infecção por *P. gingivalis***

Neste trabalho, foram avaliados 3 protocolos distintos de procedimentos realizados previamente à indução de DP por *P. gingivalis*, que foram descritos na literatura e submetidos a adaptações:

#### **4.2.2 Protocolo 1: tratamento com antimicrobianos antes da infecção**

O modelo de DP com tratamento prévio dos animais com antimicrobianos na água de beber foi baseado no protocolo descrito por BAKER et al. (1994). Os camundongos receberam Sulfametoxazol e Trimetoprima (0,42 mg/mL e 0,08 mg/mL, respectivamente) na água de beber durante 10 dias e, após 4 dias sem tratamento, a DP foi induzida.

#### **4.2.3 Protocolo 2: tratamento local com clorexidina antes da infecção**

O modelo de DP com tratamento prévio dos animais com clorexidina 0,12%, na cavidade bucal, foi baseado no protocolo descrito por LIN et al. (2017). Os camundongos receberam clorexidina a 0,12% acrescida de CMC 2%, diretamente na cavidade bucal, com auxílio de pincel, 24 horas antes da indução da DP.

#### **4.2.4 Protocolo 3: ausência de tratamento prévio antes da infecção**

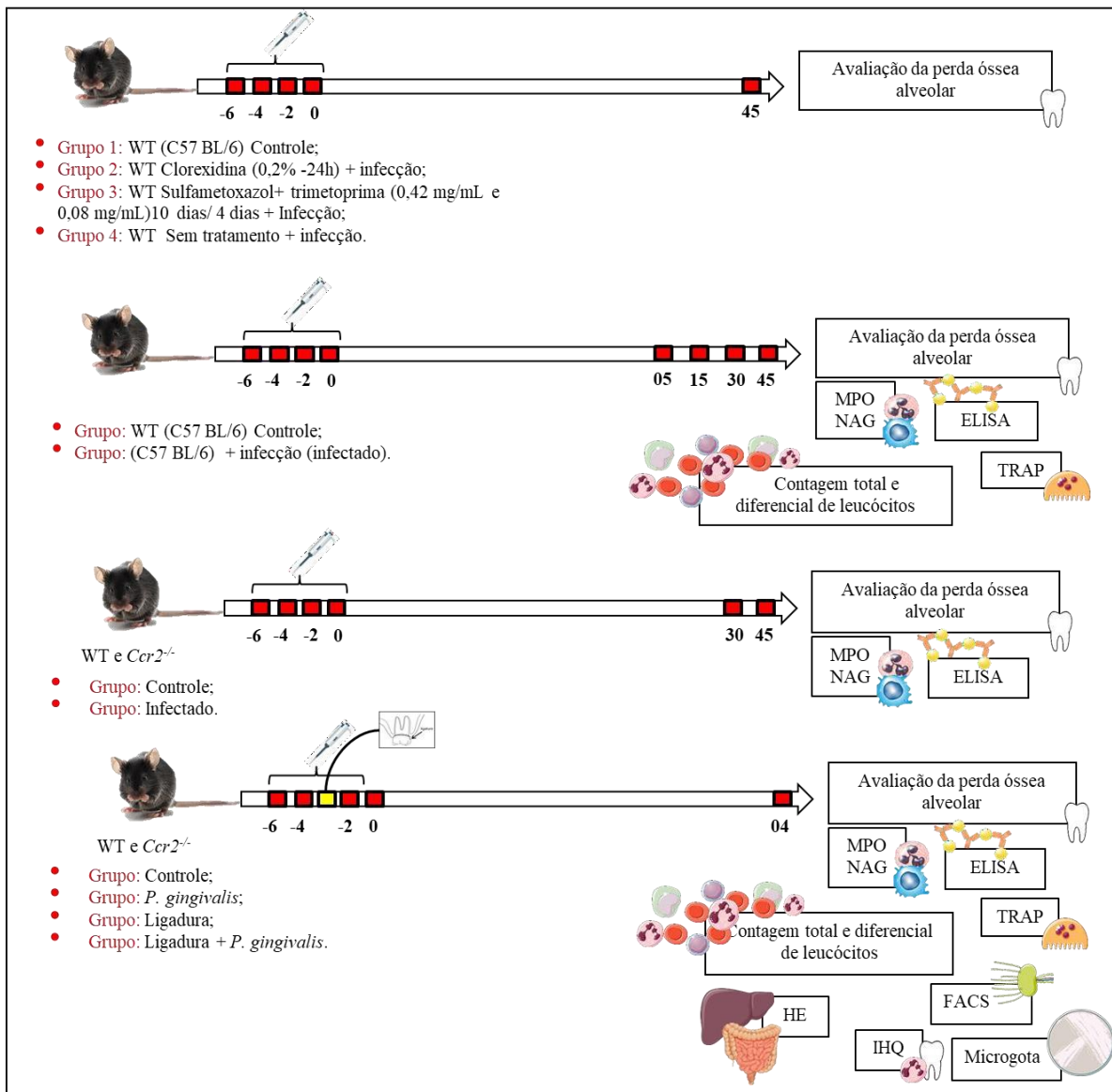
O modelo de DP sem tratamento prévio dos animais foi baseado no protocolo descrito por MCINTOSH e HAJISHENGALLIS (2013). A indução da DP pela inoculação de *P. Gingivalis* foi realizada nos camundongos na ausência de qualquer manipulação prévia da microbiota bucal.

### **4.3 Desenho experimental**

Para indução de DP, grupos de camundongos foram inoculados com *P. Gingivalis*, diretamente na cavidade bucal, com auxílio de uma micropipeta. Para isso, os camundongos receberam 100 µL de um inóculo contendo  $10^8$  UFC acrescido com 1,5% de CMC, 1 vez ao dia, durante 4 dias, com intervalo de 48 horas entre as inoculações. Os camundongos do grupo controle (sham-infectados) receberam inóculo oral contendo 100 µL de PBS 1X estéril, acrescido de 1,5% de CMC. Após a inoculação, os camundongos permaneceram 30 minutos sem água e 4 horas sem comida para que não houvesse interferências mecânicas na colonização. Após 30 e 45 dias, os camundongos foram eutanasiados, as maxilas foram removidas e processadas para as análises de perda óssea alveolar, atividade de n-

acetilglicosamina (NAG) para avaliação de macrófagos, atividade de mieloperoxidase (MPO) para avaliação de neutrófilos e avaliação da produção de mediadores inflamatórios por ELISA. A mandíbula foi armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análises posteriores. Para compreensão da cinética de inflamação do processo associado à perda óssea alveolar induzida por *P. gingivalis*, os camundongos foram divididos em grupos (controle e infectado), que foram submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal. Os grupos experimentais foram eutanasiados nos tempos de 5, 15, 30 ou 45 dias pós-infecção. Após cada período experimental foi coletado os tecidos periodontais processadas para as análises de perda óssea alveolar e avaliação da produção de mediadores inflamatórios por ELISA.

Para avaliar a perda óssea alveolar induzida por ligadura, um fio de seda 6.0 (Shalon®, Goiânia, Brasil) foi inserido em torno do segundo molar superior esquerdo e o dente contralateral foi deixado sem ligadura e utilizado como controle basal. O modelo foi baseado no protocolo descrito por SAADI-THIERS et al. (2013), em que os camundongos receberam a ligadura e também foram inoculados com *P. Gingivalis*, diretamente na cavidade bucal, com auxílio de uma micropipeta. Para isso, os camundongos receberam 100  $\mu\text{L}$  de um inóculo contendo  $10^8$  UFC acrescido com 1,5% de CMC, 1 vez ao dia, durante 4 dias, com intervalo de 48 horas entre os dias de infecção. Entre o terceiro e o quarto dia de infecção, os animais foram submetidos à inserção do fio de seda em torno do segundo molar superior esquerdo. Os camundongos do grupo controle (sham-infectados) receberam inóculo oral contendo 100  $\mu\text{L}$  de PBS 1X estéril, acrescido de 1,5% de CMC. Estes animais não foram submetidos à ligadura. Após a inoculação, os camundongos permaneceram 30 minutos sem água e 4 horas sem comida para que não houvesse interferências mecânicas na colonização. Após 4 dias, os camundongos foram eutanasiados e as maxilas foram removidas e processadas para as análises de perda óssea alveolar, NAG, MPO, imuno-histoquímica e ELISA. A figura 3 mostra o desenho experimental utilizado.



**Figura 3. Protocolo experimental.** Desenho experimental de indução de DP induzida por *P. Gingivalis* e perda óssea alveolar induzida por ligadura, associada ou não à infecção por *P. Gingivalis*.

#### 4.4 Avaliação da produção de mediadores inflamatórios

O ensaio imunoenzimático ELISA foi utilizado para quantificar os níveis de mediadores inflamatórios, como TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IL-10, CXCL-1 e CCL2 nos tecidos periodontais. Amostras de maxilas foram pesadas e processadas em solução para extração de citocinas (solução de PBS com inibidores de proteases - 0,1 mM PMSF, 0,1 mM Benzetonio clorídrico, 10 mM EDTA e 0,01 mg/mL aprotinina A, pH 7.4 e Tween 20 a 0,05%), na proporção de 1 mL para 100 mg de tecido. O tecido foi processado utilizando-se

um homogeneizador de tecidos (PowerGen 100, Fisher Scientific) e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi mantido a - 20°C para o ensaio de ELISA.

O ensaio de ELISA foi realizado utilizando *kits* comerciais (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. O anticorpo de captura para o antígeno de interesse foi adicionado a uma placa de 96 poços e incubadas por 24 h a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween 20) e bloqueadas por 1 h com PBS contendo BSA 1%, em temperatura ambiente. As amostras e o padrão de interesse foram diluídos em solução de BSA 0,1% e ambos incubados *overnight* a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e foram incubadas na presença dos anticorpos de detecção. Após 2 h, as placas foram lavadas e adicionadas às placas uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase. Depois de 20 min, as placas foram novamente lavadas e foi adicionado tampão contendo ortofenilenodiamina (OPD). A reação foi interrompida adicionando-se uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. A densidade óptica foi obtida com o uso de espectrofotômetro (MQX200, BioTeK, USA) no comprimento de onda de 490 nm. O resultado foi expresso em pg/100 mg de tecido.

#### **4.5 Medida da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)**

Após a eutanásia, as maxilas foram removidas, pesadas e processadas em tampão gelado (100 mg para 1,9 mL de tampão - pH 4,7, 0,1M NaCl, 0,02M NaPO<sub>4</sub>, 0,015M NaEDTA). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4°C, por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e adicionado NaCl 0,2% gelado ao precipitado remanescente. Após 30 segundos, foi adicionada solução gelada de NaCl 1,6% com 5% glicose (1,5 mL das soluções para 100 mg de tecido). Foi realizada a homogeneização rápida das amostras e as mesmas foram centrifugadas a 4°C, por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado novamente e foi adicionado tampão (0,05 M NaPO<sub>4</sub> (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio - HTAB) na proporção de 100 mg tecido/ 1,9 mL de tampão, em temperatura ambiente, ao precipitado remanescente. Em seguida, as amostras foram congeladas e descongeladas 3 vezes em nitrogênio líquido. Posteriormente, foram centrifugadas a 4° C, por 15 minutos a 10000 rpm e o sobrenadante coletado para o ensaio enzimático. O ensaio enzimático consiste na adição de 25 µL das amostras diluídas em concentração adequada a uma placa de 96 poços de fundo chato, em duplicata, sendo aplicado posteriormente 25 µL do substrato TMB (3,3', 5,5'-

tetrametilbenzidina), incubada a 37°C por 5 minutos e então foi adicionado 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,002%) e incubado a 37°C por 5 minutos. Logo após, foi acrescentado 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M) e então os poços foram lidos em comprimento de onda de 450 nm.

#### **4.6 Medida da atividade da enzima N-acetil-β-D-glucosaminidase (NAG)**

O processamento inicial seguiu as mesmas etapas da metodologia para o ensaio de MPO. Contudo, após a adição do tampão (*Buffer*) 2 ao sobrenadante, as amostras foram homogeneizadas rapidamente e centrifugadas a 4°C, por 10 minutos a 10000 rpm, sendo acrescido, posteriormente, 1 mL/100 mg de tecido, da solução salina 0,9%/Triton x-100 0,1% v/v (gelado) ao tubo contendo o macerado de tecido. As amostras foram então homogeneizadas e posteriormente centrifugadas a 4°C, por 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático. Foram utilizados 100 µL das amostras diluídas em tampão citrato/fosfato (pH 4,5) a uma placa de 96 poços de fundo chato, em duplicata. Em seguida, 100 µL do substrato (p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminidase) foram acrescentados e, então, a placa foi incubada a 37°C, por 10 minutos. Após essas etapas, foi feita a adição de tampão glicina 0,2 M e a placa foi avaliada em espectrofotômetro (MQX200, BioTeK, USA) em comprimento de onda de 400 nm.

#### **4.7 Análises histológicas**

Amostras de maxila, fígado e intestino foram retiradas dos camundongos, após eutanásia, as amostras foram submetidas à fixação com formalina neutra tamponada 10% por 24 horas e as maxilas posteriormente foram descalcificadas com ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 14%, por 21 dias. Após a descalcificação, o EDTA foi retirado com lavagens de 15 em 15 minutos em água corrente e o material foi deixado em *overnight* em água potável. Para o processo de inclusão, as amostras foram fixadas e passaram por um processo de desidratação por meio da utilização de concentrações crescentes de etanol e diafanização em xilol. Em seguida, as amostras receberam banhos de parafina e posteriormente foi realizada a inclusão final em bloco de parafina para posterior obtenção de cortes com espessura de 5 µm. Estas lâminas com corte histológico foram utilizadas no processo de coloração pelas técnicas de hematoxilina e eosina (H&E) em que para as amostras de fígado foram adotados os seguintes parâmetros para avaliação: (1) infiltrado, (2) edema hepático, (3) degeneração, (4) necrose, (5) hemorragia. Para cada parâmetro foi pontuado de acordo com a escala: 0: ausente (0%), 1: mínimo (1-20%), 2: leve (21-40%), 3: moderado (41-60%), 4:

acentuado (61-80%), 5: grave (81-100%) de acordo com COSTA et al. (2012). Enquanto para as amostras de intestino os parâmetros com as respectivas pontuações adotados foram: (1) infiltrado, (2) vilosidades, (3) edema, (4) erosão, (5) hemorragia, (6) hiperemia. Para cada parâmetro as alterações foram pontuadas de acordo com uma escala que pode variar entre (0) ausente a (4) muito intenso. A soma dessas pontuações representa o Escore histopatológico. As amostras de maxila foram submetidas à técnica de Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato - TRAP (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO), seguindo as recomendações do fabricante. Após a coloração, as lâminas passaram pelo processo de secagem e foram, posteriormente, montadas com Entelan® (Pró-análise, Porto Alegre, Brasil). A quantificação de células TRAP-positivas foi realizada no osso alveolar, ao longo das raízes do primeiro ou segundo molar superior e definido como número de células positivas por campo, em aumento de 1000 X.

#### **4.8 Imuno-histoquímica para neutrófilos**

Para realização desta técnica, as amostras de maxilas foram cortadas com 5 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) de espessura e dispostas em lâminas polarizadas. Em seguida, foram processadas em Trilogy™ 1X (Cell Marque, Rocklin, CA, USA) durante 2h a 56°C e 5 minutos a 95°C. Em seguida as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS 1X e posteriormente incubadas duas vezes por 15 minutos em solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  10%. Após lavagem em PBS 1X, os cortes foram cobertos pelo anticorpo primário Ly6G (V421, 1:250, BD Biosciences) e foram incubadas overnight a 4°C em câmara úmida. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS 1X e os cortes foram cobertos durante 30 minutos por anticorpo secundário IgG biotilado (anti-rat; 1:250). Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS 1X e então os cortes foram cobertos por estreptavidina-peroxidase durante 30 minutos. Logo após esta etapa, as lâminas foram lavadas em PBS 1X e então os cortes foram cobertos pela solução de 3,3 – Diaminobenzidine (DAKO). Após 5 segundos, as lâminas foram submersas em água corrente durante 10 minutos e em seguida foram submersas em hematoxilina de Harris durante 3 segundos. Após a coloração, as lâminas passaram pelo processo de secagem e foram, posteriormente, montadas com Entelan® (Pró-análise, Porto Alegre, Brasil). A quantificação de células Ly6G-positivas foi realizada no tecido periodontal mesial e distal do segundo molar superior esquerdo e definida como número de células positivas por campo, em aumento de 1000 X.

#### 4.9 Avaliação da perda óssea alveolar

Ao final de cada período experimental, foi realizada a eutanásia dos camundongos e as maxilas foram removidas. As maxilas foram, então, tratadas com solução de peróxido de hidrogênio 30 volumes, diluído em igual volume de água destilada, durante 24 horas, para remoção dos tecidos moles. Posteriormente, as maxilas foram lavadas e deixadas secar em temperatura ambiente. Para a quantificação da perda óssea alveolar, as maxilas foram coradas com solução de azul de metileno 0,3%. Para obtenção das imagens, as maxilas foram fotografadas (Kodak EasyShare C743, Manaus, Brasil) utilizando-se o aumento da objetiva do microscópio estereoscópico binocular 200 M (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Q724S-1, Diadema, Brasil). As imagens foram obtidas da região palatina dos molares superiores. Com o auxílio do programa *Image J*, a medida da área entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) foi utilizada para avaliação da perda óssea alveolar no primeiro ou segundo molar superior das maxilas analisadas.

#### 4.10 Citometria de fluxo de linfonodo cervicais

Após 4 dias de inserção do fio de ligadura, os linfonodos cervicais foram cuidadosamente retirados e macerados para a realização da citometria de fluxo. As células destes linfonodos foram contadas em câmara de Neubauer e igualmente distribuídas ( $5 \times 10^5$  células/mL) para marcação de superfície com anticorpos: CD 45 (FITc/1:200); CD 103(PerCP-cy55/ 1:50); Ly6C (PE-cy7/ 1:100); MHC II (APC-cy7/ 1:100); Ly6G (V421/ 1:400); CD11b (V500/ 1:100). Após a marcação, as amostras foram lidas no citômetro FACS Canto™ II (BD Bioscience). Foram adquiridos 30.000 eventos por amostra. A análise das leituras foi realizada no software FlowJo™ (Tree Star).

#### 4.11 Determinação do índice fagocítico

Para se determinar o índice fagocítico, foram utilizados macrófagos diferenciados a partir de células obtidas da medula óssea de camundongos C57BL/6 ou *Ccr2*<sup>-/-</sup> (BMDMs). Células da medula óssea foram removidas dos fêmures e tíbias dos animais e cultivadas em placas de Petri contendo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) acrescido de soro fetal bovino a 20% v/v e sobrenadante de cultura de células L929 a 30% v/v. As placas de Petri foram incubadas em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. As células da medula óssea, quando expostas ao sobrenadante de células L929 durante 7 a 10 dias, diferenciam-se em macrófagos. Após 10 dias, as células foram removidas da placa de Petri utilizando-se um

raspador de células e transferidas para placas de 24 poços, contendo lamínulas estéreis, em uma concentração de  $5 \times 10^5$  células / poço. Após 24 h de incubação a  $37^\circ\text{C}$ , as células foram desafiadas com  $2,5 \times 10^6$  células de *P. Gingivalis* (MOI = 5) por 1 hora. Após esse tempo, as células foram fixadas com acetona por 30 segundos e, após coloração utilizando o *kit* panótico rápido, as bactérias fagocitadas foram visualizadas ao microscópio óptico e contadas, para posterior definição do índice fagocítico, a partir da fórmula: IF= (nº de bactérias fagocitadas / nº de macrófagos contados) x (nº de macrófagos fagocíticos / nº de macrófagos contados) x 100.

#### **4.12 Avaliação de mediadores inflamatórios produzidos por macrófagos murinos**

O ensaio imunoenzimático ELISA foi utilizado para quantificar os níveis de mediadores inflamatórios, como TNF e IL-6 em amostras de sobrenadante de ensaio *in vitro*. Para isso, foram utilizados macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) de camundongos C57BL/6 ou *Ccr2*<sup>-/-</sup>, de acordo com protocolo descrito anteriormente. Após 10 dias, as células foram removidas da placa de Petri utilizando-se um raspador de células e transferidas para placas de 48 poços a uma concentração de  $2 \times 10^5$  células/ poço. Após 24 h de incubação a  $37^\circ\text{C}$ , as células foram desafiadas com  $1 \times 10^6$  células de *P. Gingivalis* (MOI =5). Foi adotado o tempo de 4 e 24 horas de incubação. Após esses tempos, os sobrenadantes foram coletados para realização do ensaio de ELISA utilizando *kits* comerciais (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), seguindo as recomendações do fabricante.

#### **4.13 Análises estatísticas**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As diferenças entre as médias foram comparadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) com pós-teste Newman-Keuls. Na comparação entre dois grupos foi utilizado o teste t de *Student* não pareado. Os resultados foram considerados significativos quando valor de  $p < 0,05$ .

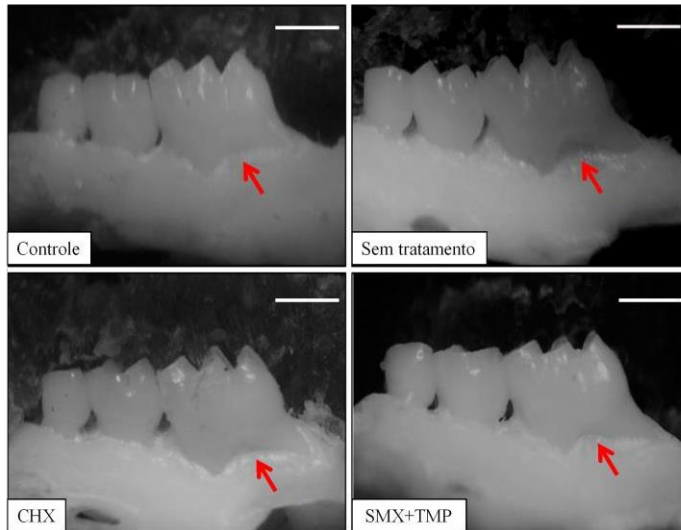
### **5 Resultados**

Para padronização do modelo de DP induzida por *P. gingivalis*, a perda óssea alveolar foi avaliada após a indução da doença com 3 protocolos distintos descritos na literatura. Os resultados mostram que, após 45 dias, a infecção por *P. gingivalis* induziu perda ósseaalveolar significativa, de modo similar, em todos os grupos avaliados (Fig. 4A e 4B). Desse

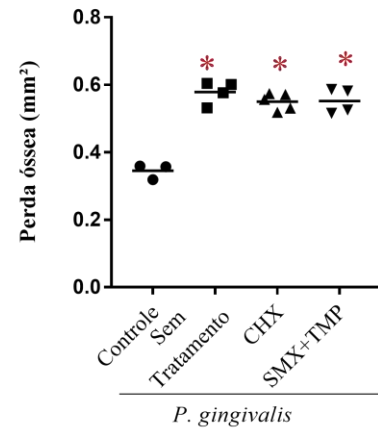


modo, o protocolo de escolha para os demais experimentos foi aquele em que não houve alteração prévia do biofilme bucal.

A)

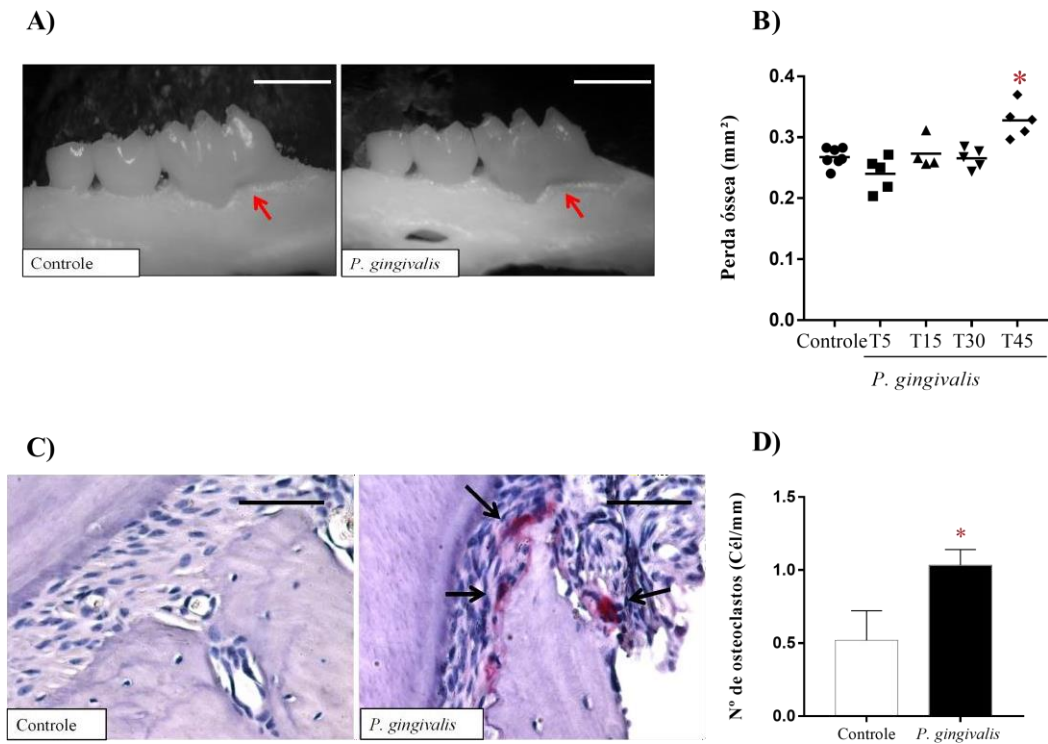


B)



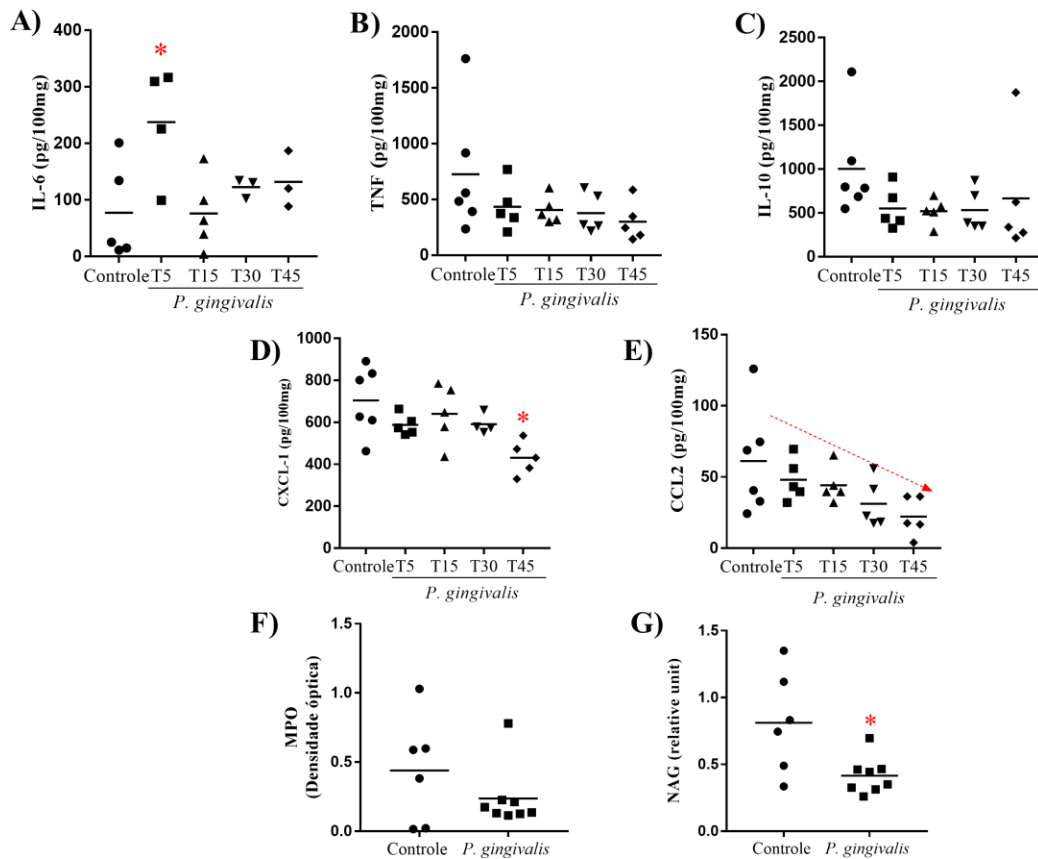
**Figura 4. Quantificação da perda óssea alveolar em camundongos C57BL/6 (WT).** (A) Imagens representativas da perda óssea alveolar. (B) Quantificação da perda óssea alveolar obtida pela medida da área entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) na região palatina do primeiro molar superior. Barra=1 mm. \*  $p < 0,05$  quando comparados aos camundongos sham-infectados (Controle).

Para compreender a cinética do processo inflamatório associado à perda óssea alveolar induzida por *P. gingivalis*, os camundongos foram divididos em grupos experimentais (controle e infectado) e eutanasiados nos tempos de 5, 15, 30 ou 45 dias pós-infecção. Ao final de cada tempo experimental, foi analisada a perda óssea alveolar pela quantificação da área entre a COA e a JCE, medida na face palatina do primeiro molar superior. Foi observada uma perda óssea alveolar significativa no tempo de 45 d.p.i (Fig. 5A e 5B), associada ao aumento no número de osteoclastos na crista óssea alveolar no mesmo tempo experimental (Fig. 5C e 5D).



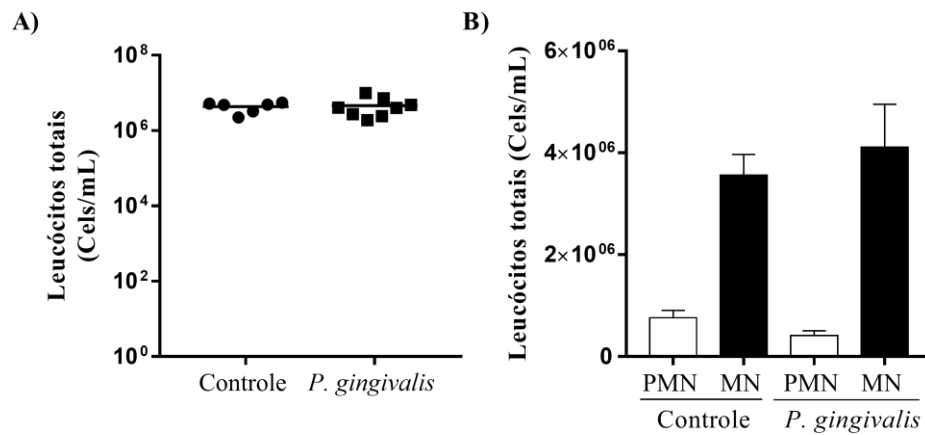
**Figura 5. Quantificação da perda óssea alveolar em camundongos C57BL/6 (WT).** (A) Imagens representativas da perda óssea alveolar. Barra = 1mm. (B) Quantificação da perda óssea alveolar obtida pela medida da área entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) na região palatina do primeiro molar superior. (C) Células TRAP positivas presentes no tecido periodontal. Barra = 50  $\mu$ m. (D) Quantificação de células TRAP positivas dispostas por milímetro de tecido avaliado. \*  $p < 0,05$  quando comparados aos camundongos sham-infectados (Controle).

Posteriormente, ao final de cada tempo experimental, foi realizada a quantificação das citocinas IL-6, TNF e IL-10 e das quimiocinas CXCL1 e CCL2 por ELISA. O infiltrado celular foi avaliado por medida da atividade enzimática de NAG e MPO nos tecidos periodontais no tempo experimental de 45 d.p.i. Observou-se aumento significativo da produção da citocina IL-6 no tempo inicial de 5 d.p.i (Figura 6A), sem alterações nos níveis das citocinas TNF (Fig. 6B) e IL-10 (Fig. 6C). Houve também uma diminuição de CXCL-1 no tempo de 45 d.p.i (Fig. 6D) e, apesar da ausência de diferenças significativas, notou-se um padrão decrescente na produção de CCL2 (Figura 6E). Não houve alterações significativas na atividade de MPO (Figura 6G), mas observa-se menor atividade de NAG (Fig. 6F).



**Figura 6. Avaliação de mediadores inflamatórios em camundongos WT ao longo da infecção e quantificação de MPO e NAG.** (A) produção de IL-6 nos tecidos periodontais, (B) TNF, (C) IL-10, (D) CXCL1 e (E) CCL2 nos tecidos periodontais obtida a partir do ensaio de ELISA. (F) Quantificação da atividade de MPO e (G) NAG nos tecidos periodontais. \*  $p < 0,05$  quando comparados aos camundongos sham-infectados (Controle).

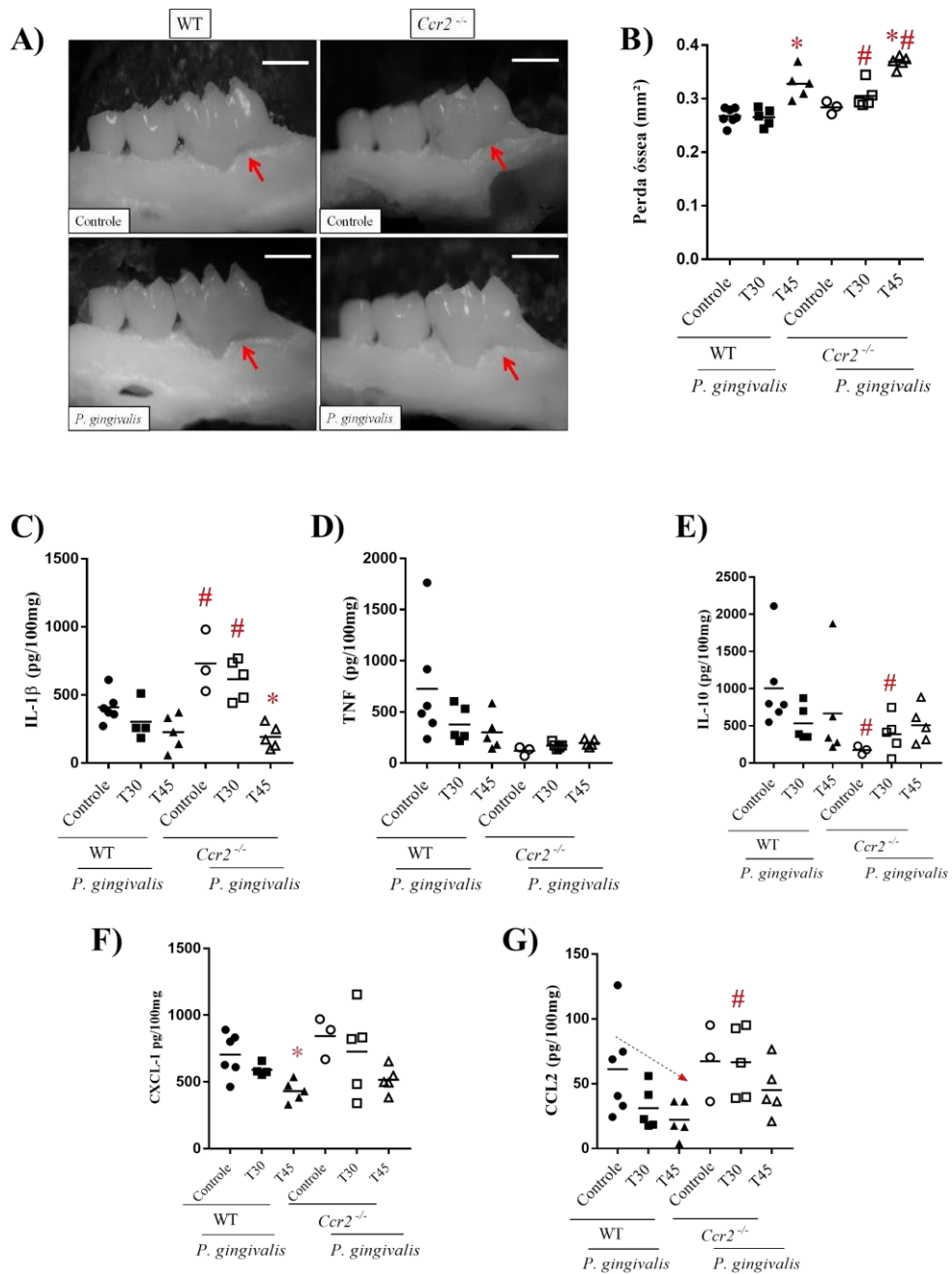
Alterações em nível sistêmico estão associadas à DP (OPPERMANN; WEIDILICH; MUSSKOPF, 2012). A fim de avaliar possíveis alterações sistêmicas no modelo experimental utilizado, os animais foram submetidos ao protocolo de indução de DP e, após 45 dias, foram coletadas amostras de sangue e analisados a quantidade e o tipo de leucócitos. Os resultados mostram que não houve alterações significativas nos parâmetros sistêmicos analisados (Fig.7 A,B).



**Figura 7. Quantificação de leucócitos no sangue em camundongos WT 45 d.p.i.** (A) Quantificação de leucócitos no sangue obtida a partir da contagem em câmara de Neubauer. (B) contagem diferencial de células: mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) obtidos a partir da análise de esfregaço sanguíneo. \*  $p < 0,05$  quando comparados aos camundongos sham-infectados (Controle).

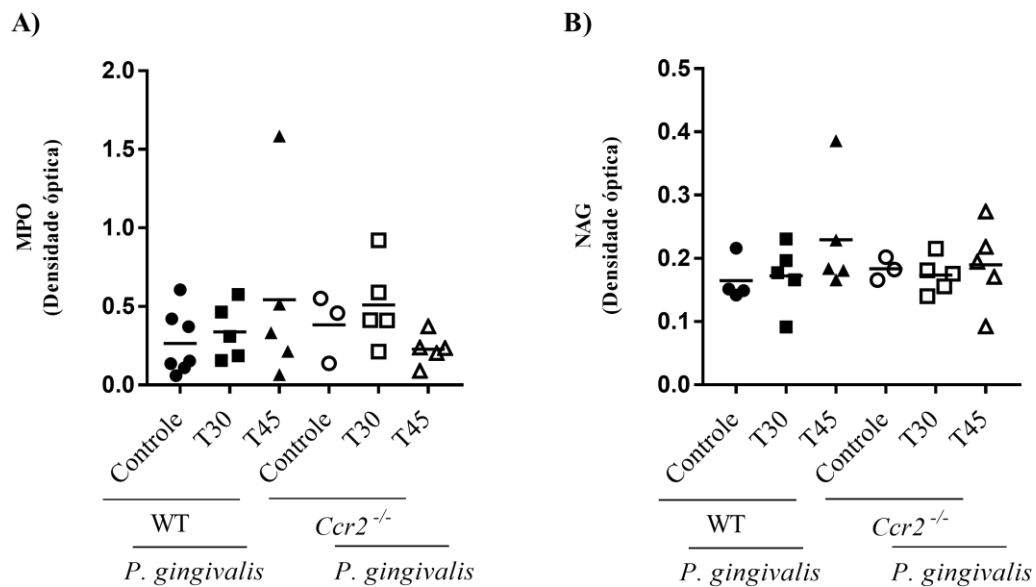
Sabe-se que algumas quimiocinas estão associadas ao recrutamento de células mononucleares para o sítio infectado (GEMMELL; CARTER; SEYMOUR, 2001). Assim, para compreender o papel de CCR2 na DP, animais WT e *Ccr2*<sup>-/-</sup> foram submetidos aos protocolos de infecção e, após 30 ou 45 dias, foram eutanasiados e os tecidos periodontais coletados para análise de perda óssea alveolar, ELISA, NAG e MPO. Os animais WT apresentaram perda óssea alveolar significativa 45 d.p.i (Fig. 8A). Por outro lado, camundongos *Ccr2*<sup>-/-</sup> apresentam perda óssea alveolar significativamente maior 30 d.p.i, quando comparados aos animais WT de mesmo tempo experimental, além de perda óssea alveolar significativa 45 d.p.i, comparados ao seu respectivo grupo controle e a camundongos WT no mesmo tempo pós-infecção (Figura 8A e 8B). Em camundongos WT não foi observada diferença na produção das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF e IL-10 (Fig. 8C, 8D e 8E). Camundongos *Ccr2*<sup>-/-</sup> apresentaram maiores níveis basais de IL-1 $\beta$ , que diminuem significativamente 45 d.p.i. (Fig. 8C). Não foi observada diferença na produção de TNF (Fig. 8D). Camundongos *Ccr2*<sup>-/-</sup> apresentam menores níveis basais de IL-10 quando comparados aos animais WT (Fig. 8E). Quanto às quimiocinas, foi observada uma menor produção de CXCL1 45 d.p.i em camundongos WT, enquanto em animais *Ccr2*<sup>-/-</sup> não foi observada diferença significativa na produção de CXCL1 (Figura 8F). Apesar da ausência de diferenças significativas, foi observado em camundongos WT um padrão decrescente na produção de CCL2 (Figura 8G). Entretanto, nos animais *Ccr2*<sup>-/-</sup>, foi observado maiores níveis de CCL2 no

tempo 30 d.p.i quando comparados aos animais WT no mesmo tempo experimental (Figura 8G).



**Figura 8. Quantificação da perda óssea alveolar e mediadores inflamatórios em camundongos WT e *Ccr2*<sup>-/-</sup> 30 e 45 d.p.i.** (A) Imagens representativas da perda óssea alveolar. (B) Quantificação da perda óssea alveolar obtida pela medida da área entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) na região palatina do primeiro molar superior. Barra=1 mm. (C) Produção de IL-1 $\beta$ , (D) TNF, (E) IL-10, (F) CXCL-1e (G)CCL2 nos tecidos periodontais obtida a partir do ELISA. \* p < 0,05 quando comparado aos camundongos sham-infectados (Controle); # p < 0,05 quando comparados aos camundongos *Ccr2*<sup>-/-</sup>.

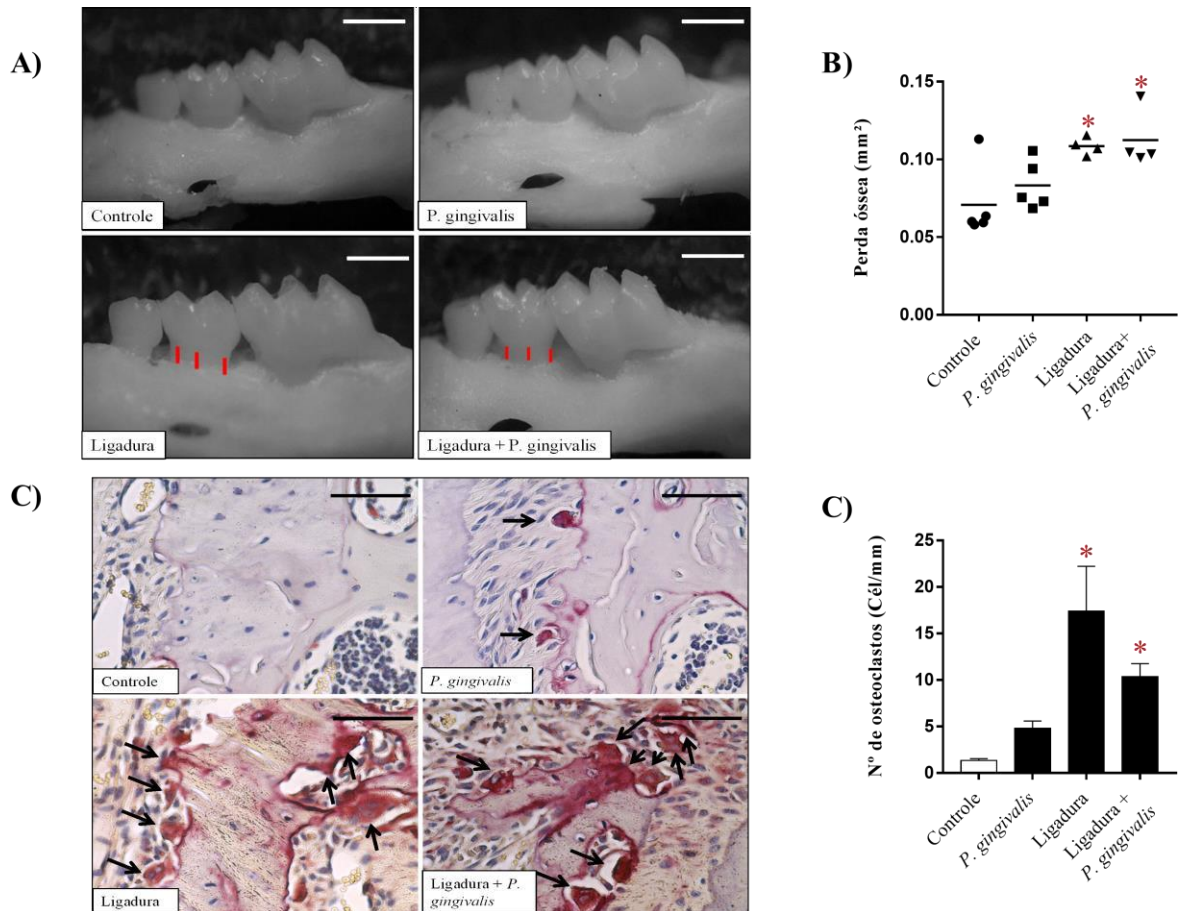
A produção de citocinas e quimiocinas impacta diretamente no infiltrado de células no periodonto (TURNER et al., 2014). Para análise do infiltrado celular nos tecidos periodontais dos animais, foi feita avaliação da atividade enzimática de NAG e MPO nos tempos experimentais de 30 ou 45 d.p.i., que consiste na medida indireta de infiltrado de neutrófilos e macrófagos. Os resultados mostram que tanto camundongos WT quanto *Ccr2*<sup>-/-</sup> não apresentaram alterações significativas na atividade de NAG e MPO nos tempos experimentais analisados (Figura 9A e 9B).



**Figura 9. Atividade de MPO e NAG em camundongos WT e *Ccr2*<sup>-/-</sup> 30 e 45 d.p.i.** (A) Quantificação da atividade de MPO e (B) NAG nos tecidos periodontais por meio de ensaio enzimático nos tecidos periodontais. \* p < 0,05 quando comparado aos camundongos sham-infectados (Controle); # p < 0,05 quando comparado aos camundongos *Ccr2*<sup>-/-</sup>.

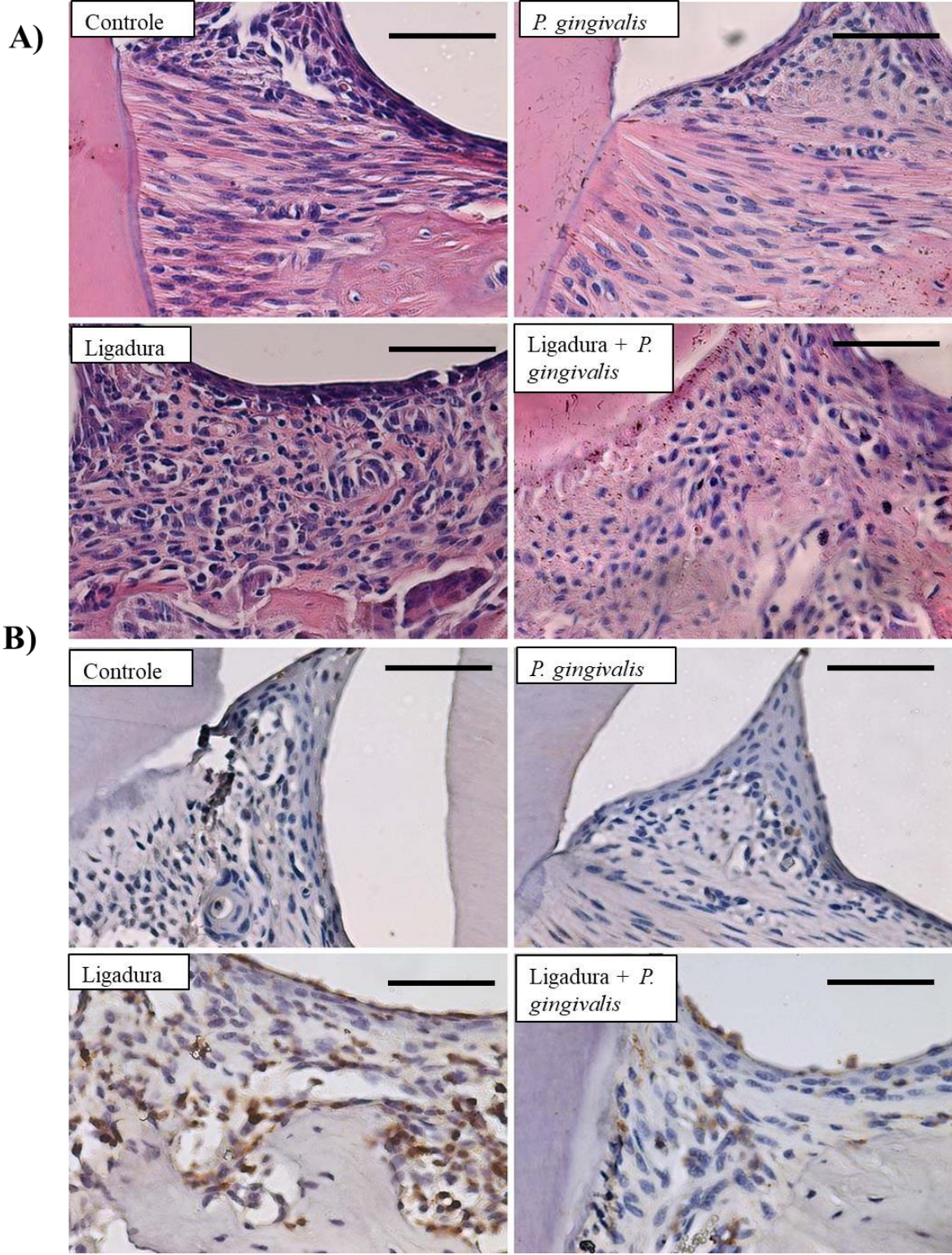
A DP é uma doença de caráter crônico e que apresenta períodos de agudização (ROJAS et al., 2005), assim determinamos também a participação de CCR2 em um processo agudo de reabsorção óssea alveolar. Para isso camundongos WT e *Ccr2*<sup>-/-</sup> foram submetidos ao protocolo de indução de perda óssea alveolar por inserção de ligadura associada ou não à infecção por *P. gingivalis*. Para padronização do modelo, animais WT foram submetidos à inserção de um fio de seda ao redor do 2º molar superior esquerdo. Quando associada à infecção por *P. gingivalis*, o fio de ligadura foi inserido entre a terceira e quarta inoculação do microrganismo na cavidade bucal e, após 4 dias da inserção da ligadura, os camundongos foram eutanasiados e os tecidos periodontais coletados para análise de perda óssea alveolar e de quantificação de osteoclastos, por meio da coloração de fosfatase ácida resistente aotartarato (TRAP). A inserção de ligadura induziu perda óssea alveolar significativa

independente da associação com *P. gingivalis* (Fig. 10A, 10B). A perda óssea alveolar, induzida por ligadura, está associada ao aumento significativo de osteoclastos (Figura 10C, 10D).

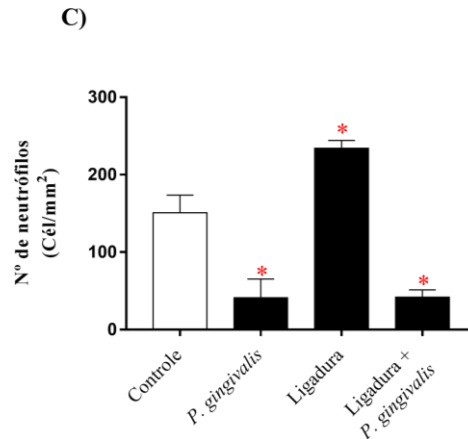


**Figura 10. Quantificação da perda óssea alveolar em camundongos WT e quantificação de células TRAP positivas, 4 dias após inserção do fio.** (A) Imagens representativas da perda óssea alveolar. (B) Quantificação da perda óssea alveolar obtida pela medida da área entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) na região palatina do segundo molar superior. Barra = 1mm. (C) Células TRAP positivas presentes no tecido periodontal. (D) Quantificação de células TRAP positivas dispostas por milímetro de tecido avaliado. Barra = 50 μm. \*  $p < 0,05$  quando comparados aos camundongos sham-infectados (Controle).

Foi realizada análise histológica dos tecidos periodontais por meio de coloração com hematoxilina e eosina (HE) e posterior quantificação de neutrófilos. Foi possível observar que a inserção de ligadura, associada ou não à infecção por *P. gingivalis*, induziu um infiltrado de células inflamatórias (Figura 11A), com maior número de neutrófilos diante a inserção do fio de ligadura. A infecção por *P. gingivalis* associada ou não ao fio de ligadura foi capaz de induzir diminuição no número de neutrófilos nos tecidos periodontais (Fig. 11C).

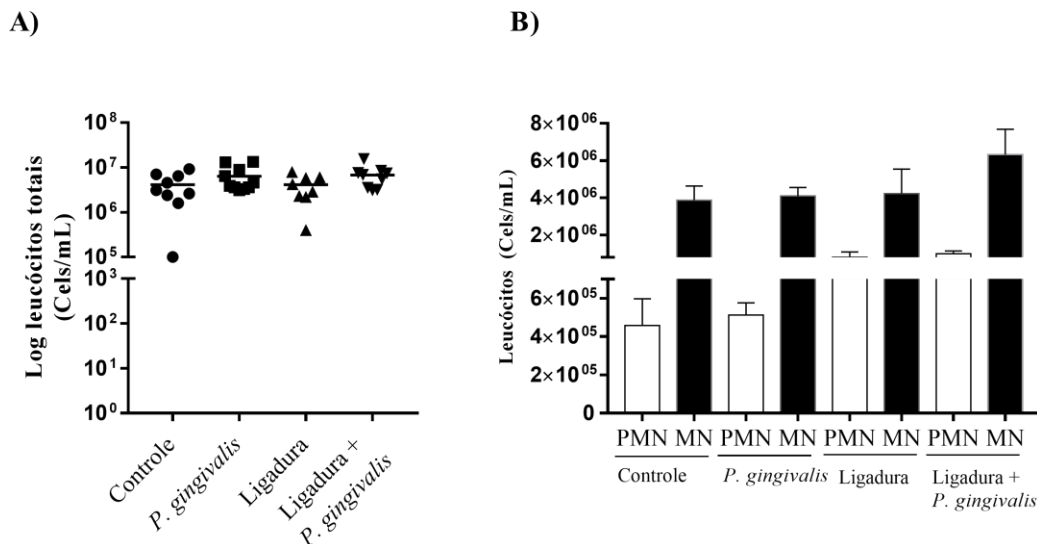






**Figura 11. Análise histopatológica e identificação de neutrófilos em camundongos WT, 4 dias após inserção do fio.** (A) Análise histopatológica foi realizada por meio da coloração de HE. Barra = 50  $\mu$ m. (B) Análise para identificação de neutrófilos realizada por meio de imunohistoquímica Barra = 50  $\mu$ m (C) quantificação de neutrófilos presentes no periodonto. \*  $p < 0,05$  quando comparado aos camundongos sham- infectados (Controle).

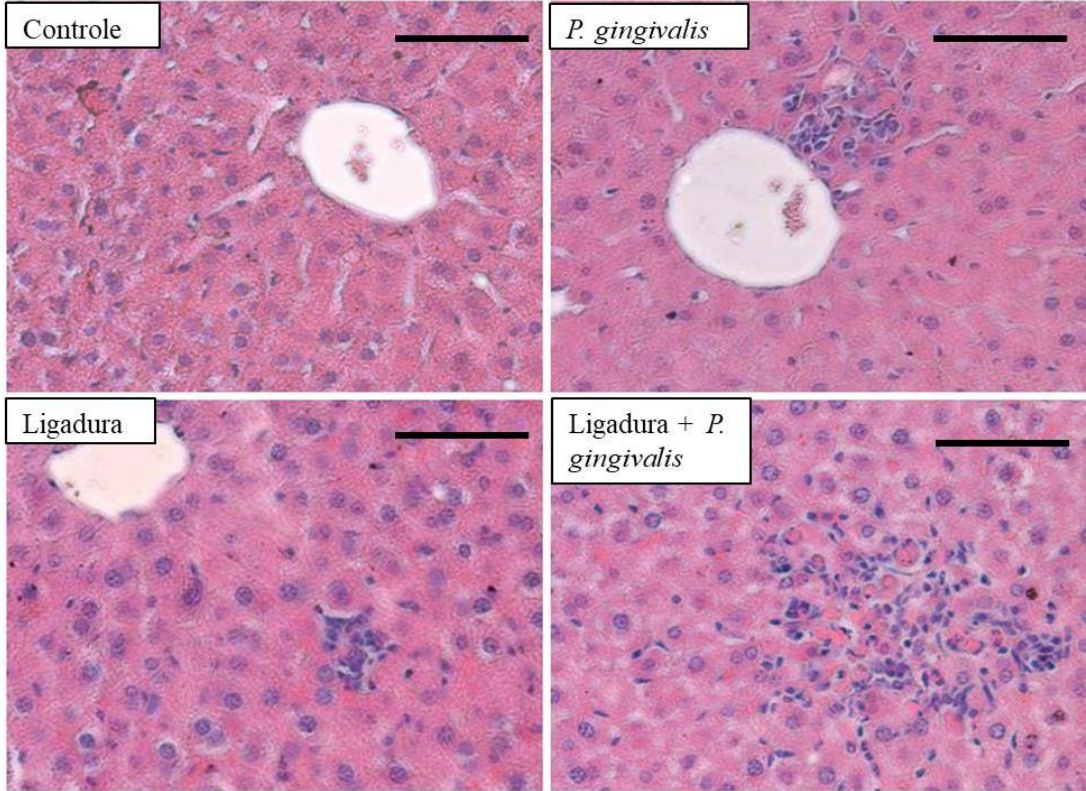
A inserção de ligadura representa um fator para maior retenção de microrganismos do biofilme bucal no sítio de inserção, que pode estar associado a uma resposta inflamatória e degradação tecidual (MARCHESAN et al., 2019). Sendo assim, a inserção de ligadura pode representar uma potente fonte de translocação microbiana e alterações sistêmicas. Os resultados do presente trabalho mostram que não houve alterações nos números de leucócitos totais no sangue (Figura 12A) e no número de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) e mononucleares (MNs) (Figura 12B).



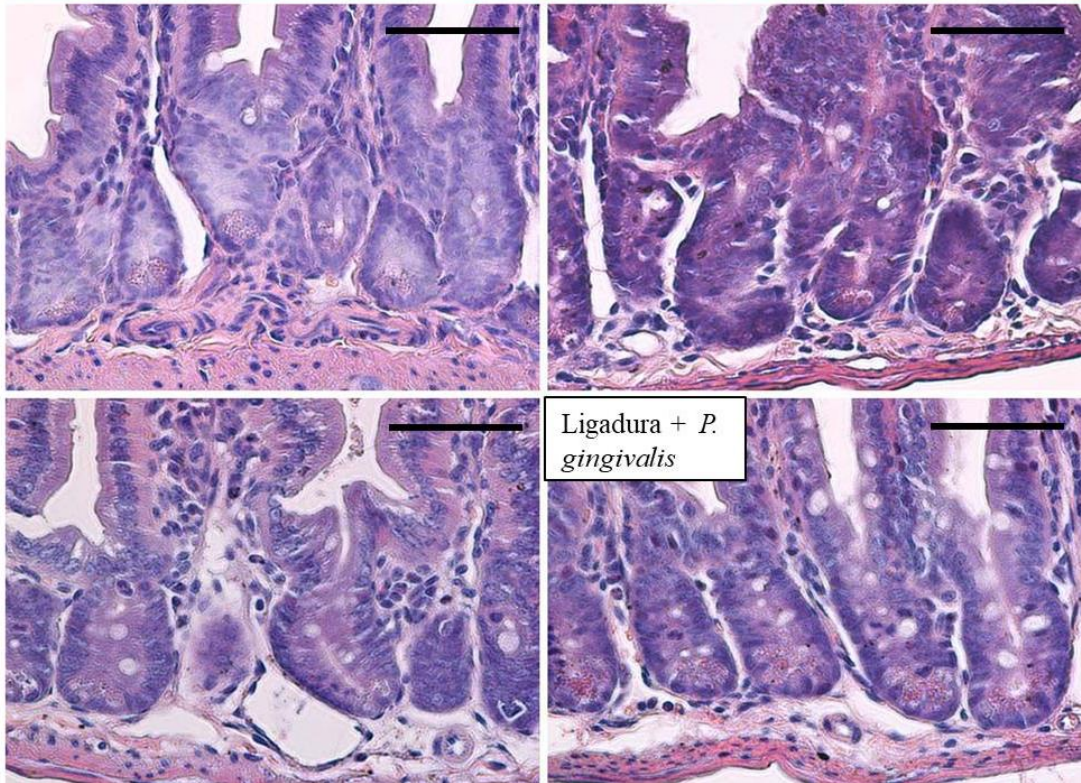
**Figura 12. Quantificação de leucócitos no sangue em camundongos WT 4 dias após inserção do fio.** (A) A quantidade de leucócitos no sangue foi obtida a partir da contagem em câmara de Neubauer. (B) A quantificação de células MN e PMN foi realizada a partir da análise de esfregaço sanguíneo. \*  $p < 0,05$  quando comparados aos camundongos sham-infectados (Controle).

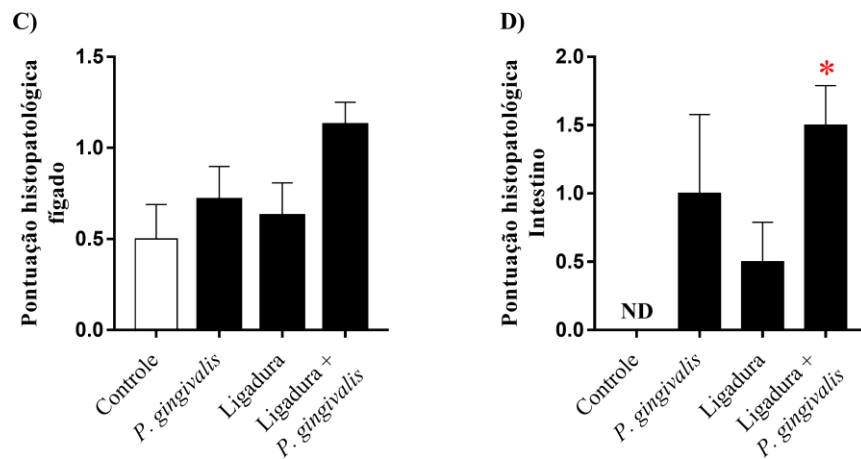
Há estudos que mostram que alterações em sítios extra bucais podem estar associados a condições bucais como a DP (ALAZAWI et al., 2017). Logo, foi realizada uma avaliação histológica do fígado e intestino dos animais, após indução de perda óssea alveolar por inserção de ligadura. Os resultados mostram que o fígado de camundongos que foram submetidos à inserção da ligadura, associada ou não à infecção por *P. gingivalis*, apresentaram um discreto infiltrado celular (Fig. 13A, Fig. 13B). Camundongos que foram submetidos apenas à inoculação de *P. gingivalis* também apresentaram discreto infiltrado celular no fígado (Fig. 13A, Fig. 13B). De modo similar, análises do intestino mostram que camundongos submetidos à inserção da ligadura, associada ou não à infecção por *P. gingivalis*, apresentaram um discreto infiltrado celular neste órgão (Fig. 13C, Fig. 13D). Entretanto, camundongos que foram submetidos apenas à inoculação de *P. gingivalis* apresentaram aumento significativo do infiltrado celular no intestino (Figura 13C e D).

A)



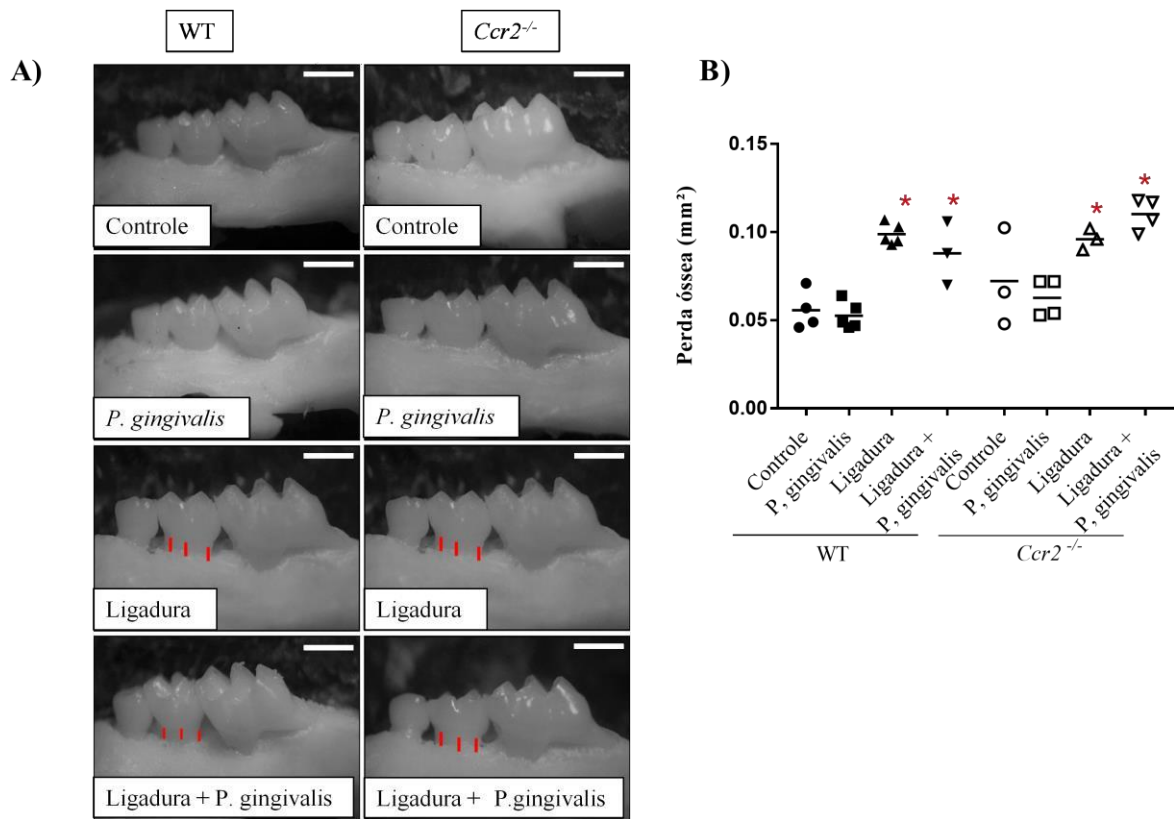
B)





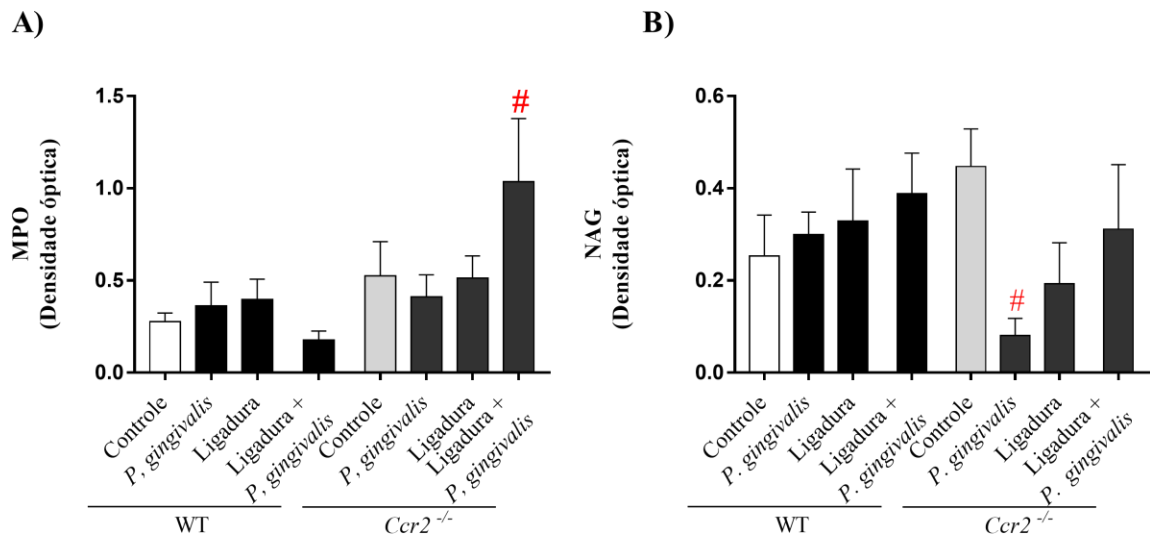
**Figura 13. Análises histopatológicas de fígado e intestino em camundongos 4 d.p.i.** (A) Infiltrado celular presente no tecido hepático, (B) discreto infiltrado celular nas vilosidades intestinais, score histopatológico (B) hepático e (D) intestinal obtido a partir da coloração de hematoxilina eosina (HE). Barra= 5  $\mu$ m. \*  $p < 0,05$  quando comparados aos camundongos sham-infectados (Controle).

Para avaliar o papel de CCR2 em um processo de perda óssea alveolar aguda, animais WT e deficientes para este receptor (*Ccr2*<sup>-/-</sup>) foram submetidos ao protocolo de indução de perda óssea por inserção de ligadura associada ou não à infecção por *P. gingivalis*. Após 4 dias os animais foram eutanasiados e os tecidos periodontais foram coletados para análise de perda óssea alveolar. Foi observada perda óssea alveolar significativa, de maneira similar, em camundongos WT e *Ccr2*<sup>-/-</sup> (Figura 14A, 14B).



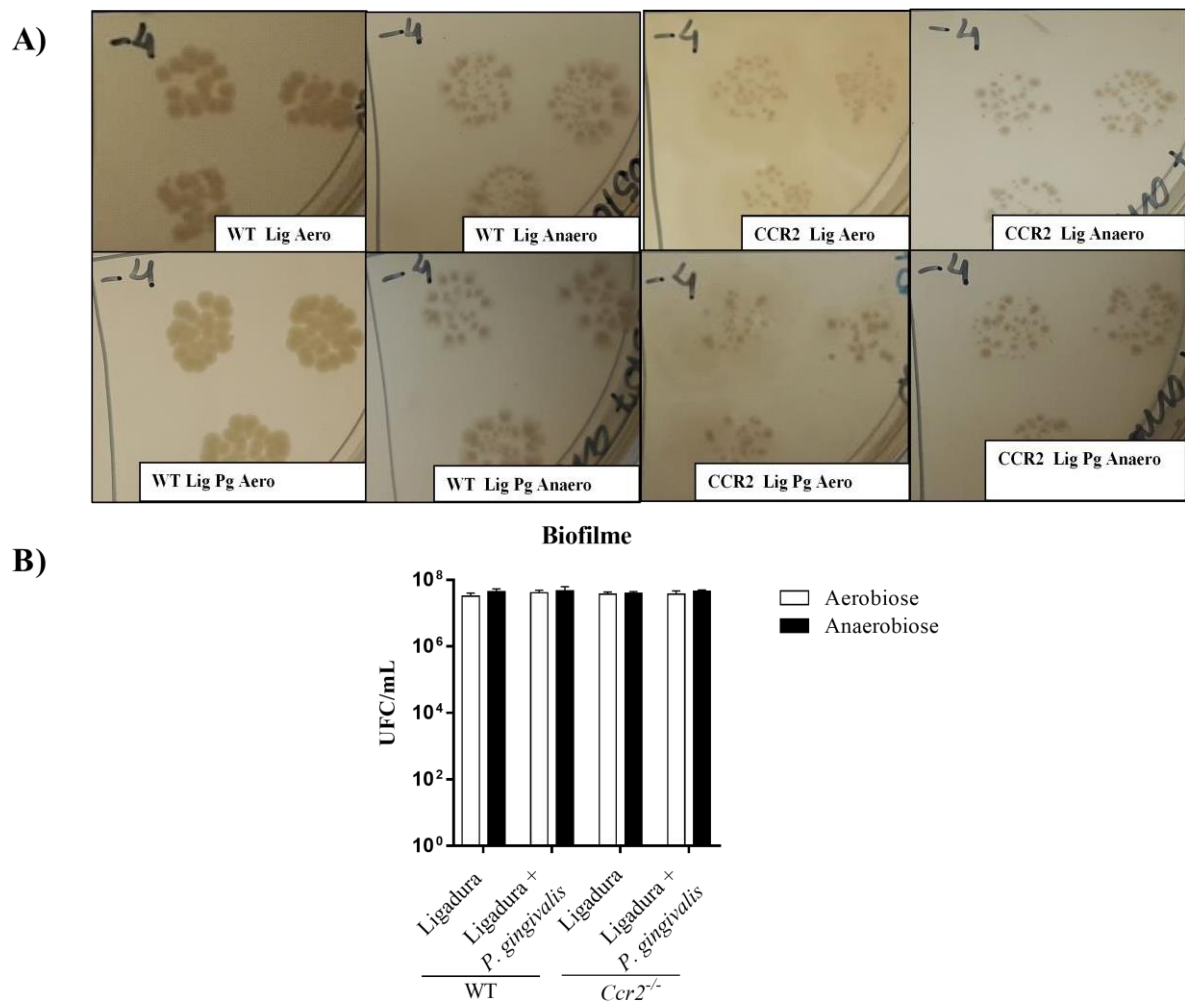
**Figura 14. Quantificação da perda óssea alveolar em camundongos WT e *Ccr2*<sup>-/-</sup> 4 dias pós-inserção da ligadura.** (A) Imagens representativas da perda óssea alveolar. (B) Quantificação da perda óssea alveolar obtida pela medida da área entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) na região palatina do primeiro molar superior. Barra =1 mm. \*  $p < 0,05$  quando comparado aos camundongos sham-infectados (Controle); #  $p < 0,05$  quando comparados aos camundongos *Ccr2*<sup>-/-</sup>.

Para análise do infiltrado celular nos tecidos periodontais dos animais, foi feita avaliação da atividade enzimática de NAG e MPO 4 dias após inserção do fio de ligadura, que consiste na medida indireta de infiltrado de neutrófilos e macrófagos. Os resultados mostram que os camundongos WT não apresentam alterações na atividade de MPO enquanto os animais *Ccr2*<sup>-/-</sup> quando a ligadura associada à infecção por *P. gingivalis* induz maior atividade desta enzima (Fig. 15A). Quanto às atividades de NAG, os animais WT não apresentaram alterações nas atividades enzimáticas; contudo, os animais *Ccr2*<sup>-/-</sup> frente a infecção por *P. gingivalis* possuem menor atividade de NAG no peridonto (Fig. 15B).



**Figura 15. Atividade de MPO e NAG em camundongos WT e *Ccr2*<sup>-/-</sup> 4 dias pós-inserção da ligadura.** (A) Quantificação da atividade de MPO e (B) NAG nos tecidos periodontais por meio de ensaio enzimático nos tecidos periodontais. \*  $p < 0,05$  quando comparado aos camundongos sham-infectados (Controle); #  $p < 0,05$  quando comparado aos camundongos *Ccr2*<sup>-/-</sup>.

A ligadura age como uma superfície de retenção de microrganismos, que desencadeiam um processo inflamatório ao assumirem um perfil disbiótico (JIAO et al., 2013). Desse modo, foi realizada a quantificação e avaliação preliminar dos microrganismos associados à ligadura. Os resultados mostram alterações nos morfotipos coloniais em relação às diferentes atmosferas de crescimento: aerobiose e anaerobiose (Figura 16A). Entretanto, não houve alteração na quantidade de microrganismos presentes na ligadura associada ou não à infecção por *P. gingivalis*, tanto nos camundongos WT quanto nos *Ccr2*<sup>-/-</sup> (Figura 16B). Contudo, como demonstrado no quadro 1 (Figura 16C), análises da ligadura de animais WT mostram maior quantidade de morfotipos coloniais em atmosfera anaeróbia. Quando a ligadura foi associada à infecção por *P. gingivalis* foi observada um predomínio de microrganismos Gram-positivos. Camundongos *Ccr2*<sup>-/-</sup> não apresentam alterações no número de colônias em atmosferas de aerobiose ou anaerobiose. Entretanto, análises da ligadura associada à infecção por *P. gingivalis*, em camundongos *Ccr2*<sup>-/-</sup>, em ambas atmosferas, também mostraram um predomínio de microrganismos Gram-positivos.



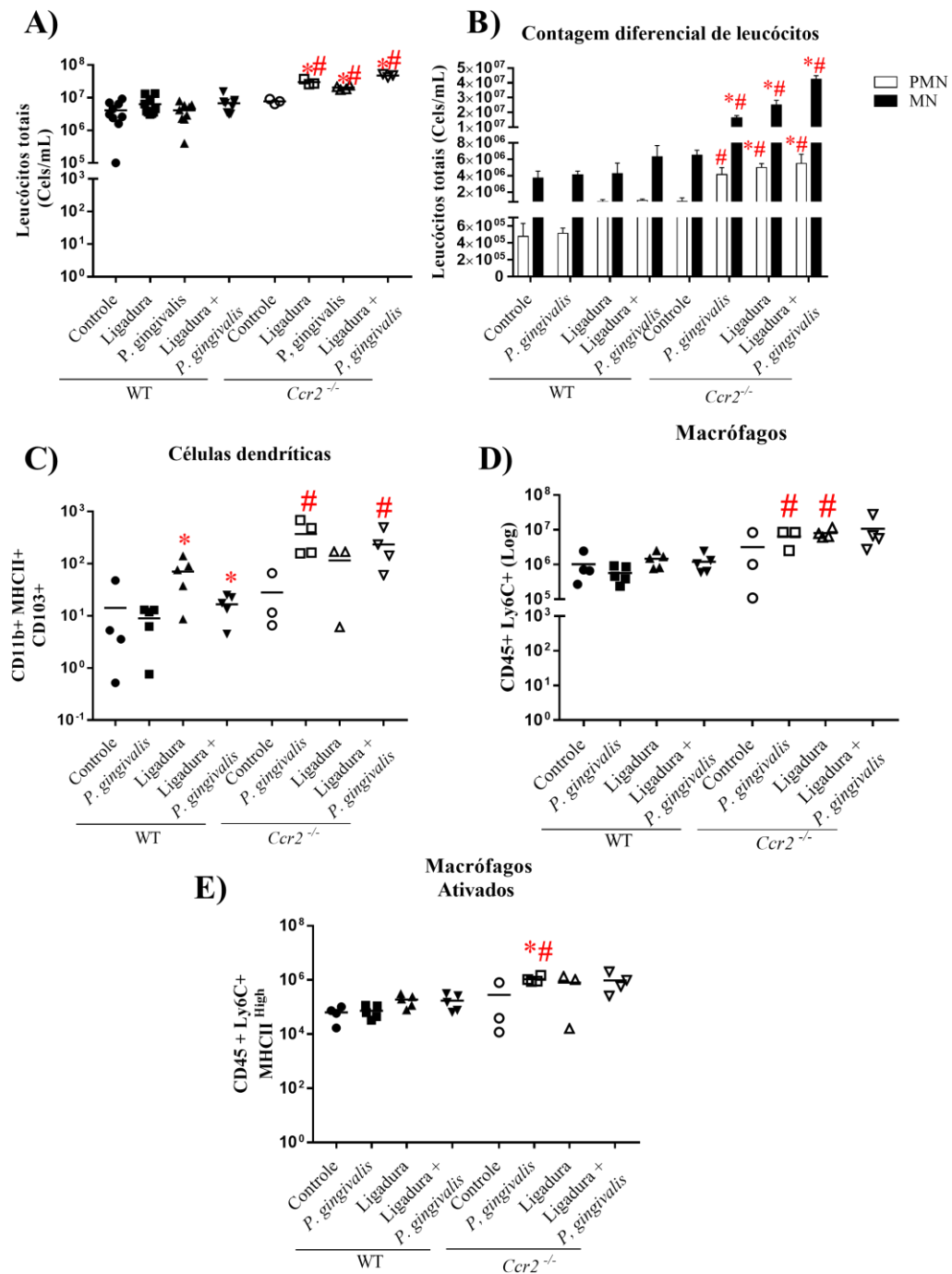
**Figura 16. Quantificação de microrganismos presentes na ligadura em camundongos WT e *Ccr2*<sup>-/-</sup> 4 dias pós-inserção.** (A) Imagens representativas das placas de cultivo dos microrganismos presentes no fio de ligadura. (B) Quantificação da concentração da microbiota associada ao fio obtida a partir da técnica de micro gota em ágar. \*  $p < 0,05$  quando comparado aos camundongos sham-infectados (Controle); #  $p < 0,05$  quando comparado aos camundongos *Ccr2*<sup>-/-</sup>.

**QUADRO 1- Análises qualitativas dos microrganismos associados à ligadura**

Atmosfera	WT Lig		WT Lig+Pg		<i>Ccr2</i> <sup>-/-</sup> Lig		<i>Ccr2</i> <sup>-/-</sup> Lig+Pg	
	Aero	Anaerobiose	Aero	Anaerobiose	Aero	Anaerobiose	Aero	Anaerobiose
Nº de colônias	2	> 5	2	> 5	3	3	> 5	> 5
Morfologias	Cocobacilos	Cocobacilos e Cocos	Cocos e Cocobacilos	Cocobacilos, Cocos	Cocobacilos	Cocobacilos e Cocos	Cocobacilos e Cocos	Cocos
Predominância	Gram -	Gram +/-	Gram -	Gram +	Gram -	Gram +	Gram+	Gram+

Foi também avaliada a quantidade e o tipo de leucócitos no sangue e nos linfonodos cervicais. Nossos resultados mostram que os animais WT não apresentaram alterações no número de leucócitos no sangue, porém a ligadura quando associada à infecção por *P. gingivalis* induziu alteração na quantidade e tipo celular de PMN e MN (Fig. 17A e 17B). Em camundongos *Ccr2*<sup>-/-</sup>, a infecção por *P. gingivalis*, associada ou não a ligadura, induziu maiores alterações tanto no número de leucócitos (Fig. 17A) quanto no tipo de células no sangue (Fig. 17B), quando comparado tanto ao seu controle quanto aos grupos experimentais correspondentes de animais WT (Fig. 17A, 17B). O tipo de células presentes nos linfonodos cervicais demonstra que, em animais WT, há aumento do número de células dendríticas após a inserção do fio de ligadura associado ou não a infecção por *P. gingivalis* (Fig. 17C). Em camundongos *Ccr2*<sup>-/-</sup> a infecção por *P. gingivalis* induziu aumento do número de células dendríticas, macrófago e macrófagos ativos (Fig. 17D e 17E) e, quando associada à ligadura, foi observado um predomínio de células dendríticas, quando estes são comparados com animais WT (Fig. 17E).

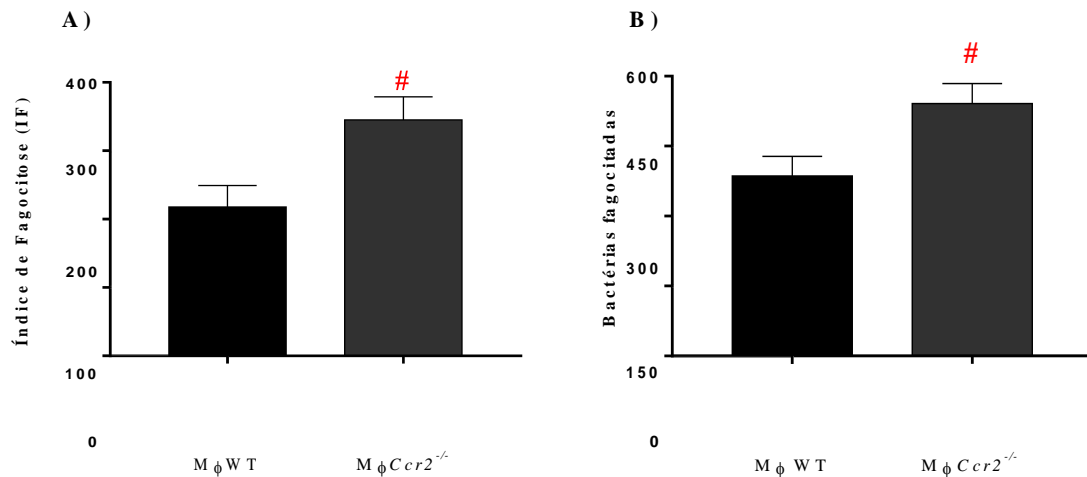




**Figura 17. Quantificação de leucócitos no sangue e células nos linfonodos cervicais em camundongos WT e *Ccr2*<sup>-/-</sup>, 4 dias pós-inserção do fio.** (A) A quantidade de leucócitos no sangue foi obtida a partir da contagem em câmara de Neubauer. (B) A quantificação de células MN e PMN foi realizada a partir da análise de esfregaço sanguíneo. A quantidade de (C) células dendríticas, (D) macrófagos e (E) macrófagos ativos presentes nos linfonodos destes animais foi obtida a partir da avaliação de marcadores inerentes analisados por meio de FACS. \*  $p < 0,05$  quando comparado aos camundongos sham-infectados (Controle); #  $p < 0,05$  quando comparado aos camundongos *Ccr2*<sup>-/-</sup>.

A fim de compreender o comportamento de células provenientes de camundongos WT ou *Ccr2*<sup>-/-</sup> frente ao estímulo bacteriano, foram realizados experimentos *in vitro*. Para isso, BMDMs derivados de animais WT ou *Ccr2*<sup>-/-</sup> foram desafiados com *P. gingivalis*, MOI = 5,

durante 1 h. Os resultados mostram que, comparativamente aos macrófagos provenientes de camundongos WT, macrófagos provenientes de camundongos *Ccr2*<sup>-/-</sup> possuem maior capacidade fagocítica (Fig. 18A) e fagocita maior quantidade do microrganismo (Fig. 18B).



**Figura 18. Quantificação de macrófagos fagocíticos e número de bactérias fagocitadas após 1h de estímulo.** (A) Índice de fagocitose (IF) obtido a partir da relação  $IF = (\text{n}^\circ \text{ de bactérias fagocitadas} / \text{n}^\circ \text{ de macrófagos contados}) \times (\text{n}^\circ \text{ de macrófagos fagocíticos} / \text{n}^\circ \text{ de macrófagos contados}) \times 100$ . (B) O número de bactérias fagocitadas foi obtido a partir da contagem de bactérias no interior de 100 células totais. \*  $p < 0,05$  quando comparados aos camundongos sham-infectados (Controle); #  $p < 0,05$  quando comparados aos camundongos *Ccr2*<sup>-/-</sup>.

## 6 Discussão

Os resultados deste trabalho mostram que a infecção por *P. gingivalis* em animais WT induz reabsorção óssea alveolar relacionada ao aumento de IL-6 em tempos iniciais, diminuição de CXCL-1 e NAG ao final do período experimental, além de um caráter decrescente na produção de CCL2. Adicionalmente, na ausência de CCR2, a infecção por *P. gingivalis* desencadeia uma resposta inflamatória mais intensa, caracterizada por uma maior produção de citocinas e quimiocinas osteoclastogênicas, que reflete em uma maior perda óssea alveolar, além de alterações sistêmicas.

Alguns trabalhos, como o desenvolvido por EBBERS et al. (2018) mostram que a utilização de antimicrobianos previamente à infecção por *P. gingivalis* promove alterações na microbiota residente e pode aumentar as chances de indução de DP, uma vez que microrganismos como *P. gingivalis* podem causar infecções transientes em modelo murino (OZ; PULEO, 2011; BALCI YUCE, 2017). Por outro lado, há trabalhos que mostram que a não utilização de antimicrobianos em modelos experimentais, previamente à infecção da cavidade bucal, preserva a arquitetura do biofilme bucal, favorecendo a colonização de *P.*

*gingivalis* (KATO et al. , 2018; SAKAGUSHI et al., 2019), uma vez que, como colonizador secundário, necessita de interações com outros microrganismos da cavidade bucal, como os colonizadores primários do gênero *Streptococcus* (HOW; SONG; CHAN, 2016). Desse modo, os resultados do presente trabalho demonstraram que, independente do tratamento prévio com antibacterianos, a infecção por *P. gingivalis* foi capaz de induzir perda óssea alveolar.

Ao longo do processo inflamatório foi observada uma perda óssea alveolar significativa no tempo de 45 d.p.i , o que corrobora o trabalho de MONASTERIO et al. (2019). Estudos mostram que a perda óssea alveolar está associada à indução da produção de mediadores inflamatórios osteoclastogênicos, produzidos por células do hospedeiro como, por exemplo, neutrófilos e fibroblastos, frente a um estímulo microbiano (KHALAF et al., 2016). Já foi demonstrado que *P. gingivalis* é capaz de promover a produção de mediadores inflamatórios e consequentemente proteínas envolvidas na osteoclastogênese, como RANKL (LIN et. al., 2014; MEULMAN et al., 2011). Dentre esses mediadores inflamatórios inclui-se IL-6, TNF, IL-10, CXCL-1 e CCL2. IL-6 é uma citocina que induz a ativação e formação de osteoclastos de maneira indireta, por induzir a produção de RANKL (FENG; GUO; MINQI, 2019). IL-6 é encontrada em altas concentrações no periodonto de pacientes com DP (KOSHY et al., 2019; DÍAZ-ZÚÑIGA et al., 2019; MOKEEM et al., 2018). Nossos resultados mostram uma produção significativa de IL-6 em tempos iniciais (5 d.p.i), o que pode ter contribuído para o processo de ativação de osteoclastos, entretanto não foram observadas alterações na produção de TNF. Trabalhos mostram que TNF é importante para invasão das bactérias nos tecidos periodontais por ativação da proteína Rab5, importante proteína em processos endocíticos e que regula o tráfego intracelular de patógenos, como demonstrado por KATO et al. (2014). Por outro lado, um estudo desenvolvido *in vitro* mostra que há degradação de TNF mediada por gingipaínas produzidas pela *P. gingivalis* (MEŽYK- KOPEĆ et al., 2004).

Os resultados apresentados no presente trabalho mostram que a inoculação de *P. gingivalis* não alterou a produção de IL-10, citocina anti-inflamatória responsável também por proteger a matriz extracelular durante a inflamação (LACRAZ et al., 1995; HOWARD et al., 1992) e pela supressão de citocinas durante a patogênese da DP (SASAKI et al. , 2008). Trabalhos mostram que, *in vitro*, o estímulo de fibroblastos com LPS de *P. gingivalis*, em alta concentração, induziu a produção de IL-10 (MORANDINI et al., 2011; TRINDADE et al., 2011). Contudo, em um estudo desenvolvido por WANG et al. (2018), cultura de

fibroblastos associados à patogênese de líquen plano foram estimulados com LPS de *P. gingivalis* e foi observada uma diminuição da produção de IL-10 nos tempos experimentais iniciais. Além disso, DUAN et al. (2018) demonstraram que a infecção por *P. gingivalis* em camundongos C57BL/6 diminuiu a produção de IL-10 nos tempos experimentais avaliados.

A presença de um infiltrado neutrofílico é bem descrita em modelos de DP, como demonstrado por BRECX e PATTERS (1985), utilizando primatas não humanos e por IDEGUCHI et al. (2019) em modelo associando ligadura e infecção por *P. gingivalis* em camundongos. Por outro lado, já foi demonstrado que a serino fosfatase B (SerB), outro importante fator de patogenicidade de *P. gingivalis*, suprime a produção de IL-8, alterando o recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção (PALM, KHALAF, BENGTSSON, 2013; TAKEUCHI et al., 2013; BAINBRIDGE et al., 2010). Os resultados corroboram esses dados, ao mostrar uma menor produção de CXCL-1 no tempo de 45 d.p.i. A mieloperoxidase (MPO) é uma hemoproteína presente em neutrófilos que desempenha um importante papel na resposta antimicrobiana (GALIJASEVIC, S., 2019). JAGELS et al. (1996) demonstraram que a gingipaína Kgp é responsável por inibir a liberação de MPO. Os resultados encontrados mostram que não houve alteração na atividade de MPO, o que, associada à menor produção de CXCL-1, pode ter contribuído para um menor infiltrado de neutrófilo no sítio periodontal de camundongos inoculados com *P. gingivalis*.

Os resultados também mostram uma produção decrescente de CCL2. CCL2 é uma quimiocina envolvida no recrutamento de monócitos/macrófagos para o sítio inflamatório, sintetizada por diferentes células sob estímulo de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  (ELSAFIEN, K. et al., 2019). CCL2 é encontrada em altas concentrações no fluido crevicular de pacientes com DP (STADLER et al., 2016). *P. gingivalis*, como demonstrado por ZENG et al. (2017) e DAMGAARD et al. (2017), é capaz de induzir o aumento da produção de CCL2 *in vitro* e pode induzir a adesão endotelial de monócitos via ICAM-1 (WU et al., 2019). N-acetilglicosaminidase (NAG) é uma enzima produzida principalmente por macrófagos (COELHO, B.A. et al., 2014), cuja detecção é utilizada para avaliação indireta do recrutamento dessas células. Os resultados mostram uma menor atividade de NAG, sugerindo menor influxo de macrófagos, o que corrobora estudo realizado por CASTRO et al. (2017), que mostra que as gingipaínas produzidas por *P. gingivalis* inibem a migração e a atividade fagocítica de macrófagos, por promoverem a clivagem rápida do

receptor CD14. ZHUANG et al. (2018) demonstraram que macrófagos do tipo M2 são importantes no controle da perda óssea alveolar induzida por ligadura.

CCR2 é um receptor de quimiocinas expresso principalmente por monócitos e, ao interagir com o ligante CCL2, promove o recrutamento de macrófago para o sítio infeccioso (FANTUZZI, L. et al., 2019; COVINO, D.A.; SABBATUCCI, M.; FANTUZZI, L., 2016). KHAN et al. (2015) demonstraram, *in vitro*, que a presença de CCR2 é importante para ativação de osteoclastos, células importantes para o metabolismo ósseo, relacionadas diretamente ao dano tecidual observado na DP (LI et al., 2018). Na ausência de CCR2, no modelo de DP induzido por *P. gingivalis*, foi observada maior perda óssea alveolar no tempo de 45 d.p.i. Entretanto, no modelo agudo de indução de perda óssea alveolar por inserção de ligadura, os resultados mostram que camundongos WT ou *Ccr2*<sup>-/-</sup> submetidos ao protocolo de ligadura associada ou não a infecção por *P. gingivalis*, em nossas condições, apresentam perda óssea alveolar semelhante. TADDEI et al. (2012) demonstraram, em seu modelo de remodelamento ósseo alveolar não-infeccioso, que camundongos *Ccr2*<sup>-/-</sup> apresentaram menor osteoclastogênese.

GOES et al. (2012) demonstraram que a inserção de ligadura promove alterações sistêmicas, como leucocitose, em ratos. No presente trabalho foi possível observar leucocitose na associação de ligadura com infecção por *P. gingivalis* - quando comparado ao grupo que foi submetido à ligadura sem infecção. O acometimento sistêmico gerado pela inserção de ligadura também foi demonstrado por MESTER et al. (2019) e PESSOA et al. (2018), que mostraram o acometimento e comprometimento do fígado em ratos. Os resultados apresentados mostram um discreto infiltrado celular no fígado dos camundongos submetidos à inserção de ligadura, associada ou não à infecção por *P. gingivalis*. O intestino destes animais também foi avaliado, uma vez que a partição da microbiota bucal em doença inflamatória intestinal já foi demonstrada (ISMAIL et al., 2012; KOSTIC et al. 2012). Camundongos submetidos à ligadura associada à infecção por *P. gingivalis* apresentaram alterações intestinais discretas. Estudo feito por BOLEI et al. (2019) mostra que *P. gingivalis* também comporta-se como um “microrganismo chave” no intestino, estabelecendo a disbiose no sítio. Quanto às respostas sistêmicas avaliadas, na ausência de CCR2, foram observadas alterações no sangue, como leucocitose e aumento de PMNs e MNs. Nos linfonodos cervicais foi observado um aumento de células dendríticas, macrófagos e macrófagos ativados frente ao estímulo por *P. gingivalis*. FUJIMURA et al. (2015) demonstraram que o bloqueio

farmacológico de CCR2 induziu diminuição de células totais no sangue dos animais, diminuição de linfócitos B, bem como a presença de células mononucleares.

Observou-se que a ausência de CCR2 não interferiu na quantidade de microrganismos presentes no fio da ligadura. Esses dados corroboram dados apresentados por ABE e HAJISHENGALLIS (2014) em que, 5 dias após a inserção da ligadura, não foram observadas alterações no número de microrganismos anaeróbios cultiváveis associados à ligadura que foi inserida em camundongos fêmeas, demonstrando uma capacidade rápida de resposta do hospedeiro aos microrganismos ali presentes. Entretanto, foi possível observar no presente trabalho, uma diferença quanto as características morfológicas de microrganismos presentes no fio. Por outro lado, os dados *in vitro* mostram que macrófagos derivados de animais *Ccr2<sup>-/-</sup>* apresentam maior índice fagocítico, apresentando maior número de bactérias fagocitadas e demonstrando assim que macrófagos *Ccr2<sup>-/-</sup>* apresentam maior capacidade de controle bacteriano. Por outro lado, GOMES et. al. (2013), em modelo de sepse, demonstraram que eixo CCR2/CCL2 é importante para o controle de infecção por *Escherichia coli*. DAVIS; NAKAMURA; WEISER (2011) também demonstraram, *in vivo*, que o eixo CCR2/CCL2 é importante para o controle de infecção por *Streptococcus pneumoniae*. Assim, o receptor CCR2 possui papel importante no que diz respeito ao controle microbiano. Entretanto, na DP induzida por *P. gingivalis*, outros fatores estão envolvidos e precisam ser investigados.

## 7 Considerações finais

Os resultados deste trabalho demonstram que a *P. gingivalis* induz perda óssea alveolar independente do uso prévio de antimicrobianos. Este fenótipo está associado ao aumento de IL-6 em tempos iniciais e subversão ativa de neutrófilos com menor produção de CXCL1 e, consequentemente, menor número desse tipo celular no sítio periodontal. Na ausência de CCR2 é observado maior hiperatividade no contexto agudo do quadro patológico, com participação principalmente de macrófagos, o que influencia na maior perda óssea alveolar observada em modelo crônico de indução da DP. Além disso, esta perda óssea está associada a altos níveis de IL-1 $\beta$  e menores níveis de IL-10. Sendo assim, CCR2 apresenta impacto no contexto de modulação da resposta imunológica frente a um estímulo bacteriano característico da DP e consequentemente no remodelamento ósseo. Entretanto, são necessários maiores estudos para elucidar os mecanismos pelos quais a ausência de CCR2 impacta, em termos gerais, no controle da infecção e da resposta imune nos tecidos periodontais no contexto inflamatório da DP induzida por *P. gingivalis*.

## Referências

- A.KAYAL, R. The Role of Osteoimmunology in Periodontal Disease. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1–12, 2013.
- ABE, T.; HAJISHENGALLIS, G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *Journal of immunological methods*. v.394, p.1-2, 2013.
- ALAZAWI, W. et al. Periodontitis is associated with significant hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *PLOS ONE*. v.12, n.12, 2017.
- ARUNI, W.; VANTERPOOL, E.; OSBOURNE, D. et al. Sialidase and Sialoglycoproteases Can Modulate Virulence in *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity*. v.79, n.7, p. 2779-2791, 2011.
- ARWEILER, N.B., NETUSCHIL, L. The Oral Microbiota. In: Schwartz A. (eds) Microbiota of the Human Body. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 902, 2016.
- AVILA, M.; OJCIUS, DM.; YILMAZ, Ö. The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest. *DNA and Cell Biology*, v. 28, n. 8, p. 405-411, 2009.
- BAINBRIDGE, B. et al. Role of *Porphyromonas gingivalis* phosphoserine phosphatase enzyme SerB in inflammation, immune response, and induction of alveolar bone resorption in rats. *Infection and immunity*. v. 78, n.11, 2010.
- BAKER, P.J., EVANS, R.T., ROOPENIAN, D.C. Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and induced alveolar bone loss in immunocompetent and severe combined immunodeficient mice. *Arch Oral Biol*. v.39, n.12, 1994.
- BALCI YUCE, H. Animal studies in field of periodontology: experimental periodontal and periimplant disease induction. *Cumhuriyet Dental Journal*, v.20, n.1, p.62-71, 2017.
- BAO, K. et al. Role of *Porphyromonas gingivalis* gingipains in multi-species biofilm formation. *BMC Microbiology*, v. 14, n. 1, p. 1–8, 2014.
- BARROS, S. P. et al. Therapeutic effect of a topical CCR2 antagonist on induced alveolar bone loss in mice. *Journal of Periodontal Research*, v. 46, n. 2, p. 246–251, 2011.
- BELIBASAKIS, G.N.; REDDI, D.; BOSTANCI, N. *Porphyromonas gingivalis* induces RANKL in T-cells. *Inflammation*.v. 34, n. 2, p. 133-8, 2011.
- BODET, C.; CHANDAD, F.; GRENIER, D. Potentiel pathogénique de *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* et *Tannerella forsythia*, le complexe bactérien rouge associé à la parodontite. *Pathologie Biologie*, v. 55, n. 3–4, p. 154–162, 2007.
- BOLEI, L. et al. Oral bacteria colonize and compete with gut microbiota in gnotobiotic mice. *International journal of oral Science*. v.11, n.1, 2019.
- BOSE, S.; CHO, J. Role of chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in neurodegenerative diseases. *Arch. Pharm. Res*. v.36, p. 1039–1050, 2013.

- BOSTANCI, N.; BELIBASAKIS, G. N. Porphyromonas gingivalis: An invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiology Letters*, v. 333, n. 1, p. 1–9, 2012.
- BOTERO, J.E.; RÖSING, C.K.; DUQUE, A.; JARAMILLO, A.; CONTRERAS, A. Periodontal disease in children and adolescents of Latin America. *Periodontology 2000*, v. 67, n. 1, 2015.
- BOYCE, B. et al. Regulation of bone remodeling and emerging breakthrough drugs for osteoporosis and osteolytic bone metastases. *Kidney International*. v. 63, 2003.
- BRECX, M.; PATTERS, M. R. Morphology of polymorphonuclear neutrophils during periodontal disease in the cynomolgus monkey. *Journal of Clinical Periodontology*. v.12, n.7, p.591–606, 1985.
- BRUNNER, J.; SCHERES, N.; EL IDRISSE, N.B. et al. The capsule of *Porphyromonas gingivalis* reduces the immune response of human gingival fibroblasts. *BMC Microbiology*. v. 10, n. 5, 2010.
- BURNS, E. et al. Cutting Edge: TLR2 Is Required for the Innate Response to Porphyromonas gingivalis: Activation Leads to Bacterial Persistence and TLR2 Deficiency Attenuates Induced Alveolar Bone Resorption. *The Journal of Immunology*, v. 177, n. 12, p. 8296–8300, 2006.
- CARVALHO-FILHO, P C et al. Role of *Porphyromonas gingivalis* HmuY in Immunopathogenesis of Chronic Periodontitis. *Mediators of inflammation*. v.2016, 2016.
- CASTRO, S.A. et al. *Porphyromonas gingivalis* gingipains cause defective macrophage migration towards apoptotic cells and inhibit phagocytosis of primary apoptotic neutrophils. *Cell death & disease*. v. 8, n.3, p.2644, 2017.
- CEKICI, Ali et al. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*. v. 64, n.1, 2014.
- CHAKRAVARTI, A. et al. Surface RANKL of Toll-like receptor 4–stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. *Blood*. v. 114, n.8, 2009.
- CHANDKI, R.; BANTHIA, P.; BANTHIA, R. Biofilms: A microbial home. *Journal of Indian Society of Periodontology*, n. 15, v. 2, p. 111-114, 2011.
- CHO, T. et al. Importance of diversity in the oral microbiota including candida species revealed by high-throughput technologies. *International Journal of Dentistry*, v. 2014, 2014.
- CHOI, EK. et al. Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in endothelial cells, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 44, n.1, p.51–58, 2005.
- COELHO, B.A. et al. N-acetylglucosaminidase, myeloperoxidase and vascular endothelial growth factor serum levels in breast cancer patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. v. 68, n. 2, p. 185-189, 2014.
- COSTA V.V. et al. A Model of DENV-3 Infection That Recapitulates Severe Disease and Highlights the Importance of IFN- $\gamma$  in Host Resistance to Infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. v.6, n.5, 2012.



- COSTALONGA, M.; HERZBERG, M. C. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunology Letters*, v. 162, n. 2, p. 22–38, 2014.
- COVINO, D.A.; SABBATUCCI, M.; FANTUZZI, L. The CCL2/CCR2 Axis in the Pathogenesis of HIV-1 Infection: A New Cellular Target for Therapy?. *Current Drug Targets*. v.17, n.76, 2016.
- DAMGAARD, C. et al. *Porphyromonas gingivalis*-induced production of reactive oxygen species, TNF- $\alpha$ , IL-6, CXCL8 and CCL2 by neutrophils from localized aggressive periodontitis and healthy donors: Modulating actions of red blood cells and resolvin E1. *Journal of periodontal research*. V.52, n. 2, p. 246-254, 2017.
- DARVEAU, R. P. The oral microbial consortium's interaction with the periodontal innate defense system. *DNA and cell biology*, v. 28, n. 8, p. 389–95, 2009.
- DARVEAU, Richard P et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infection and immunity*. v.72, n.9, 2004.
- DASHPER, S. G. et al. *Porphyromonas gingivalis* uses specific domain rearrangements and allelic exchange to generate diversity in surface virulence factors. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. JAN, p. 1–17, 2017.
- DAVIS, K.M. et al. Nod2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of *S. pneumoniae* colonization in mice. *The Journal of clinical investigation*. v. 121, n.9, 2011.
- DE PABLO, P. et al. Periodontitis in systemic rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 5, n. 4, p. 218–224, 2009.
- DEO, P.N.; DESHMUKH, R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *J Oral Maxillofac Pathol*.v.23, n.1, p.122-128, 2019.
- DESHMANE, S.L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. v. 29, n.6, 2009.
- DEVINE, D.A.; MARSH, P.D.; MEADE, J. Modulation of host responses by oral commensal bacteria, *Journal of Oral Microbiology*. v.7, n.1, 2015.
- DEWHIRST, F. E. et al. The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology*, v. 192, n. 19, p. 5002–5017, 2010.
- DÍAZ-ZÚÑIGA, J et al. Serotype b of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* triggers pro-inflammatory responses and amyloid beta secretion in hippocampal cells: a novel link between periodontitis and Alzheimer's disease?. *Journal of oral microbiology*. v.11, n.1, 2019.
- DIXON, D. R.; BAINBRIDGE, B. W.; DARVEAU, R. P. Modulation of the innate immune response within the periodontium. *Periodontology 2000*, v. 35, p. 53–74, 2004.

- DUAN, X. et al. *Porphyromonas gingivalis* induces exacerbated periodontal disease during pregnancy. *Microbial Pathogenesis*. v.124, p.145-151, 2018.
- EBBERS, M. et al. Interplay between *P. gingivalis*, *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* in murine alveolar bone loss, arthritis onset and progression. *Scientific Reports*. v. 8, n. 1, 2018.
- ELKADI, O.M. et al. Evaluation of Level of TNF- $\alpha$  in Chronic Periodontitis Patients with gestational diabetes mellitus after phase i periodontal therapy. *Egyptian dental journal*. v.64, p.229:238, 2018.
- ELSAAFIEN, K. et al. Chemoattraction and Recruitment of Activated Immune Cells, Central Autonomic Control, and Blood Pressure Regulation. *Frontiers in physiology*. v. 10, n. 984, 2019.
- FANTUZZI, L. et al. Dual CCR5/CCR2 targeting: opportunities for the cure of complex disorders. *Cellular and Molecular Life Sciences*. p. 1–18, 2019.
- FENG, W.; GUO, J.; LI, M. RANKL-independent modulation of osteoclastogenesis. *Journal of Oral Biosciences*. v. 61, n.1, p.16-21, 2019.
- FINE, D. H. et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as an early colonizer of oral tissues: epithelium as a reservoir?. *Journal of clinical microbiology*. v.48, n.12, 2010.
- FINE, N. et al. Distinct Oral Neutrophil Subsets Define Health and Periodontal Disease States. *Journal of Dental Research*, v. 95, n. 8, p. 931-938, 2016.
- FITZSIMMONS, T.R.; GE, S.; BARTOLD, P. M. Compromised inflammatory cytokine response to *P. gingivalis* LPS by fibroblasts from inflamed human gingiva. *Clinical Oral Investigations*. v. 22, n. 2, p. 919-927, 2018.
- FLEMING, D.; RUMBAUGH, K. P. Approaches to Dispersing Medical Biofilms. *Microorganisms*, v. 5, n.2, p.1-15, 2017.
- FRENCKEN, J.E. et al. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. *J Clin Periodontol*. v.44, 2017.
- FUJIMURA, N. et al. CCR2 inhibition sequesters multiple subsets of leukocytes in the bone marrow. *Sci Rep*. v.5, 2015.
- GALIJASEVIC, S. The development of myeloperoxidase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 29, n. 1, p. 1-7, 2019.
- GARLET, G.P., CARDOSO, C.R.B., CAMPANELLI, A.P., et al. The essential role of IFN- $\gamma$  in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *Microbes and Infection*. v.10, n.5, p.489–496, 2008.
- GEMMELL, E. et al. Chemokines in human periodontal disease tissues. *Clinical and experimental immunology*. v. 125, n.1, 2001.
- GOES, P. et al. Effect of alendronate on bone-specific alkaline phosphatase on periodontal bone loss in rats. *Archives of Oral Biology*. v. 57, n.11, p.1537-1544, 2012.

- GOMES, R. N et al. Bacterial clearance in septic mice is modulated by MCP-1/CCL2 and nitric oxide. *Shock (Augusta, Ga.)*. v. 39, n.1, 2013.
- GOTO, K.T. et al. Hyperocclusion Stimulates Osteoclastogenesis via CCL2 Expression. *J Dent Res*, 011 Jun; v. 90, n. 6, 2011.
- GRDOVIĆ, N. et al. Association of CXCL12 gene promoter methylation with periodontitis in patients with diabetes mellitus type 2. *Archives of Oral Biology*. v. 72, p. 124–133, 2016.
- GREER, A. et al. Site-Specific Neutrophil Migration and CXCL2 Expression in Periodontal Tissue. *J Dent Res*. v.95, n.8, p.946–952, 2016.
- HAFFAJEE, A.D. et al. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*, v. 23, p. 196–205, 2008.
- HAIJSHENGALLIS, G. et al. Role of complement in host-microbe homeostasis of the periodontium. *Seminars in immunology*, v. 25, n. 1, p. 65-72, 2013.
- HAIJSHENGALLIS, G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends in Immunology*. v.35, n.1, p. 3–11, 2014.
- HAIJSHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature reviews. Immunology*. v. 15, n.1, p.30-44, 2015.
- HAIJSHENGALLIS, G., CHAVAKIS, T., HAIJSHENGALLIS, E., LAMBRIS, J. D. Neutrophil homeostasis and inflammation: novel paradigms from studying periodontitis. *Journal of Leukocyte Biology*, v.98, n.4, p.539–548, 2015.
- HAIJSHENGALLIS, G.; DARVEAU, R.P.; CURTIS, M.A. The Keystone Pathogen Hypothesis. *Nature reviews Microbiology*, v. 10, n. 10, p. 717-725, 2012.
- HAIJSHENGALLIS, G.; GENCO, R.J. Downregulation of the DNA-binding activity of nuclear factor-kappaB p65 subunit in *Porphyromonas gingivalis* fimbria-induced tolerance. *Infection and immunity*. v.72, n.2, 2004.
- HAIJSHENGALLIS, G.; LAMONT, R. J. Dancing with the Stars: how Choreographed Bacterial Interactions Dictate Nososymbiocity and Give Rise to Keystone Pathogens, Accessory Pathogens, and Pathobionts. *Trends in Microbiology*, v.24, n.6, 2016.
- HASEGAWA, Y. et al. Role of *Porphyromonas gingivalis* SerB in gingival epithelial cell cytoskeletal remodeling and cytokine production. *Infection and immunity*. v.76, n.6, 2008.
- HE, J., LI, Y., CAO, Y. et al. The oral microbiome diversity and its relation to human diseases. *Folia Microbiol* , v.60, n. 1, p.69:80, 2015.
- HERATH, T. D. K. et al. Heterogeneous *Porphyromonas gingivalis* LPS modulates immunoinflammatory response, antioxidant defense and cytoskeletal dynamics in human gingival fibroblasts. *Scientific Reports*, v. 6, n. August, p. 1–15, 2016.
- HOLT, S.C.; KESAVALU, L.; WALKER, S.; GENC, C. A. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology 2000*, v. 20, p.168-238, 1999.

- HOW, K.Y.; SONG, K.P.; CHAN, K.G. *Porphyromonas gingivalis*: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Frontiers in Microbiology*. v. 7, n. 53, 2016.
- HOWARD, M. et al. Biological Properties of Interleukin 10. *Journal of Clinical Immunology*. v. 12, n. 4, 1992.
- IDEGUCHI, H. T. *et al.* Molecular imaging assessment of periodontitis lesions in an experimental mouse model. *Clin Oral Invest*. v.23, p.821–827, 2019.
- IMAI, M. et al. Major outer membrane proteins from *Porphyromonas gingivalis*: strain variation, distribution, and clinical significance in periradicular lesions. *European Journal of Oral Sciences*. v.113, n.5, p.391–399, 2005.
- ISMAIL, Y. et al. Investigation of the enteric pathogenic potential of oral *Campylobacter concisus* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *PloS one*. v. 7, n.5, 2012.
- IWAI, T. Periodontal bacteremia and various vascular diseases. *Journal of Periodontal Research*, v. 44, n. 6, p. 689–694, 2009.
- JAGELS, M.A. et al. Cleavage of the Human C5A Receptor by Proteinases Derived from *Porphyromonas gingivalis*. *Intracellular Protein Catabolism*. p. 155-164, 1996.
- JIA, G et al. The oral microbiota – a mechanistic role for systemic diseases. *British dental journal*, v.224, n.6 , 2018.
- JIAO, Y. et al. Induction of bone loss by pathobiont-mediated Nod1 signaling in the oral cavity. *Cell host & microbe*. v. 13, n.5, 2013.
- JOTWANI, R.; CUTLER, C.W. Fimbriated *Porphyromonas gingivalis* is more efficient than fimbria-deficient *P. gingivalis* in entering human dendritic cells in vitro and induces an inflammatory Th1 effector response. *Infect Immun*. v.72, n.3, p.1725–1732, 2004.
- KADOWAKI, T.; NAKAYAMA, K.; OKAMOTO, N. K. *Porphyromonas gingivalis* Proteinases as Virulence Determinants in Progression of Periodontal Diseases. *J Biochem*. v. 128, p. 153-159, 2000.
- KASSEBAUM, N. J. et al. Global Burden of Severe Periodontitis in 1990-2010: A Systematic Review and Meta-regression. *Journal of Dental Research*, v.93, n.11, p.1045–1053, 2014.
- KATO, T. et al. Oral Administration of *Porphyromonas gingivalis* Alters the Gut Microbiome and Serum Metabolome. *mSphere*, v. 3, p. 5, 2018.
- KATO, Y. et al. TNF- $\alpha$  augmented *Porphyromonas gingivalis* invasion in human gingival epithelial cells through Rab5 and ICAM-1. *BMC Microbiology*. v. 14, n. 1, 2014.
- KHALAF, H.; PALM, E.; BENGTSSON, T. Cellular Response Mechanisms in *Porphyromonas gingivalis* Infection- Periodontitis - A Useful Reference, Pachiappan Arjunan. *IntechOpen*, 2017.
- KHAN, S.A.; KONG, E.F.; MEILLER, T.F.; JABRA-RIZK, M.A. Periodontal Diseases: Bug Induced, Host Promoted. *PLoS Pathogens*, v. 11, n. 7, 2015.

- KIM, M.S.1, DAY, C.J., MORRISON, N.A. MCP-1 is induced by receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, promotes human osteoclast fusion, and rescues granulocyte macrophage colony-stimulating factor suppression of osteoclast formation. *J Biol Chem.* v. 280, n. 16, 2005.
- KOSHY, B. et al. Array analysis for T-cell associated cytokines in gingival crevicular fluid: Identifying altered profiles associated with periodontal disease status. *Journal of Dentistry.* v.85, p.39-46, 2019.
- KOSTIC, A.D. et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome research.* v.22, n.2, 2012.
- KUBONIWA, M.; LAMONT, R.J. Subgingival biofilm formation. *Periodontology 2000.* v. 52, n. 1, p. 38-52, 2010.
- LACRAZ, S. et al. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest.* v.96, n.5, 1995.
- LAHEIJ, A. M. G. A. et al. The impact of virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* on wound healing in vitro. *Journal of Oral Microbiology,* v. 7, n. 1, p. 1–8, 2015.
- LAMONT, R.J.; HAJISHENGALLIS, G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends in molecular medicine,* v. 21, n. 3, p. 172-183, 2015.
- LI, Y.; JACOX, L.A.; LITTLE, S.H.; KO, CC. Orthodontic tooth movement: The biology and clinical implications. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences.* v. 34, n. 4, p. 207-214, 2018.
- LIF HOLGERSON, P. et al. Maturation of Oral Microbiota in Children with or without Dental Caries. *PLOS ONE.* v.10, n.5, 2015.
- LIN, J. et al. *Porphyromonas gingivalis* exacerbates ligature-induced, RANKL-dependent alveolar bone resorption via differential regulation of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4. *Infection and immunity.* v. 82, n.10, 2014.
- LIN, M. et al. Different engagement of TLR2 and TLR4 in *Porphyromonas gingivalis* vs. ligature-induced periodontal bone loss. *Braz. oral res,* v. 31, n. 63, 2017.
- MAEKAWA, T. et al. *Porphyromonas gingivalis* Manipulates Complement and TLR Signaling to Uncouple Bacterial Clearance from Inflammation and Promote Dysbiosis. *Cell Host & Microbe,* v. 15, n. 6 , p. 768 - 778, 2014.
- MAGER, D. L. et al. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *Journal of Clinical Periodontology,* v. 30, n. 7, p. 644–654, 2003.
- MARCHESAN, J. et al. An experimental murine model to study periodontitis. *Nature protocols.* v. 13, n.10, 2018.
- MARSH, P.D. Dental Plaque as a Microbial Biofilm. *Caries Res,* v. 38, n. 3, p. 204–211, 2004.

- MARTIN, B. et al. A new mathematical model of bacterial interactions in two-species oral biofilms. *PLoS ONE*, p.12, n.3, 2017.
- MCINTOSH, M.L., HAJISHENGALLIS, G. Inhibition of *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontal bone loss by CXCR4 antagonist treatment. *Molecular oral microbiology*. v.27, n. 6, p. 449-457, 2012.
- MESTER, A. et al. Periodontal disease may induce liver fibrosis in an experimental study on wistar rats. *Journal of Periodontology*. v. 90, p. 911– 919, 2019.
- MEULMAN, T. et al. Impact of *Porphyromonas gingivalis* inoculation on ligature-induced alveolar bone loss. A pilot study in rats. *J Periodont Res*. v.46, p. 629–636., 2011.
- MEZYK-KOPEC, R. et al. Inactivation of membrane tumor necrosis factor alpha by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and immunity*. v.73, n.3, 2005.
- MOKEEM, S.A. et al. Clinical and radiographic periodontal status and whole salivary cotinine, IL-1 $\beta$  and IL-6 levels in cigarette- and waterpipe-smokers and E-cig users. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v.61, p.38-43, 2018.
- MONASTERIO, G. et al. Capsular-defective *Porphyromonas gingivalis* mutant strains induce less alveolar bone resorption than W50 wild-type strain due to a decreased Th1/Th17 immune response and less osteoclast activity. *J Periodontol*. v.90, p.522– 534, 2019.
- MORANDINI, A.C.F. et al. Periodontal ligament and gingival fibroblasts participate in the production of TGF- $\beta$ , interleukin (IL)-8 and IL-10. *Braz. oral res*. v.25 n.2, 2011.
- MURAKAMI, Y. et al. *Porphyromonas gingivalis* Fimbria-Induced Expression of Inflammatory Cytokines and Cyclooxygenase-2 in Mouse Macrophages and Its Inhibition by the Bioactive Compounds Fibronectin and Melatonin. *ISRN dentistry*, 2012.
- NAKAO, R. et al. Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* elicit a mucosal immune response. *PloS one*. v. 6, n.10, 2011.
- NAKAYAMA, M.; OHARA, N. Molecular mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*-host cell interaction on periodontal diseases. *The Japanese Dental Science Review*, v. 53, n. 4, p. 134-140, 2017.
- NATIVEL, B. et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides act exclusively through TLR4 with a resilience between mouse and human. *Scientific reports*. v.7, n.1, 2017.
- NAZIR, M. A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International journal of health sciences*, v. 11, n. 2, p. 72–80, 2017.
- OH, T-J.; EBER, R.; WANG, H-L. Periodontal diseases in the child and adolescent. *Journal of clinical periodontology*, v. 29, n. 5, p. 400-410, 2002.
- OPPERMANN, R.V.; WEIDLICH, P.; MUSSKOPF, M.L. Periodontal disease and systemic complications. *Braz. oral res*. v. 26, n.1, p. 39-47, 2012.
- OZ, H.S.; PULEO, D.A. Animal models for periodontal disease. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011.

- PALM, E.; KHALAF, H.; BENGTSSON, T. *Porphyromonas gingivalis* downregulates the immune response of fibroblasts. *BMC Microbiology*. v.13, n.155, 2013.
- PALMA, P. V.; LEITE, I. C. Epidemiology and social inequalities of periodontal disease in Brazil. *Frontiers in public health*. v.2, n.203, 2014.
- PALOMINO, D.C.T.; MARTI, L.C. Chemokines and immunity. *einstein*. v.13, n.3, p. 469-73, 2015.
- PAPAPANOU, P.N.; SUSIN, C. Periodontitis epidemiology: is periodontitis under-recognized, over-diagnosed, or both?. *Periodontology 2000*, v. 75, p. 45–51, 2017.
- PERIASAMY, S.; KOLENBRANDER, P.E. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Builds Mutualistic Biofilm Communities with *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* Species in Saliva. *Infection and Immunity*. v.77, n.9, 2009.
- PESSOA, L.S. et al. One or two ligatures inducing periodontitis are sufficient to cause fatty liver. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. v. 23, n.3, p.269-276, 2018.
- ROJAS, B. et al. Presencia de microorganismos productores de b-lactamasa en dientes de pacientes con periodontitis apical crónica supurativa / Presence of microorganisms producing b-lactamases in teeth of patients with suppurative chronic apical periodontitis. *Rev. Fed. Odontol. Colomb*. v.25, p.15-22, 2005.
- SAADI-THIERS, K. et al. Periodontal and Systemic Responses in Various Mice Models of Experimental Periodontitis: Respective Roles of Inflammation Duration and *Porphyromonas gingivalis* Infection. *Journal of Periodontology*. v.84, n.3, p.396–406, 2013.
- SAHINGUR, S.E.; YEUDALL, W.A. Chemokine function in periodontal disease and oral cavity cancer. *Front. Immunol*. v.6, n.214, 2015.
- SAITO, S. et al. REVIEW ARTICLE: Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.63, p.601-610, 2010.
- SAKAGUCHI, W. et al. Detection of anti-citrullinated protein antibody (ACPA) in saliva for rheumatoid arthritis using DBA mice infected with *Porphyromonas gingivalis*. *Archives of Oral Biology*, v.108, 2019.
- SASAKI, H. et al. T Cell Response Mediated by Myeloid Cell-Derived IL-12 Is Responsible for *Porphyromonas gingivalis*-Induced Periodontitis in IL-10-Deficient Mice. *The Journal of Immunology*. v.180, n.9, p.6193-6198, 2008.
- SIDDIQUI, J.A., PARTRIDGE, N.C. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein 1 and Parathyroid Hormone Action on Bone. *Frontiers in Endocrinology*, v. 8, n. 49, 2017.
- SILVA, I.; BRANCO, J.C. Rank/Rankl/opg: literature review. *Acta Reumatol Port*. v.36, n.3, 2011.
- SILVA, N. et al. Host response mechanisms in periodontal diseases. *Journal of Applied Oral Science*, v. 23, n. 3, p. 329–355, 2015.

- SINGH, A.; WYANT, T.; ANAYA-BERGMAN, C. et al. The Capsule of *Porphyromonas gingivalis* Leads to a Reduction in the Host Inflammatory Response, Evasion of Phagocytosis, and Increase in Virulence. *Infection and Immunity*, v. 79, n. 11, p. 4533-4542, 2011.
- SMALLEY, J.W.; OLCZAK, T. Heme acquisition mechanisms of *Porphyromonas gingivalis* – strategies used in a polymicrobial community in a heme-limited host environment. v. 32, n. 1, p. 1-23, 2017.
- SOCHALSKA, M.; POTEMPA, J. Manipulation of Neutrophils by *Porphyromonas gingivalis* in the Development of Periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol.* v.7, n.197, 2017.
- SOCRANSKY, S. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology.* v.25, p. 134-144, 1998.
- SOUTO, G.R. et al. Relationship Between Chemokines and Dendritic Cells in Human Chronic Periodontitis. *J Periodontol.* v. 85, n. 10, p. 1416-1426, 2014.
- STADLER, A. F. et al. crevicular fluid levels of cytokines/chemokines in chronic periodontitis: A meta-analysis. *J Clin Periodontol.* v.43, p.727– 745, 2016.
- STADLER, A. F., et al. Gingival crevicular fluid levels of cytokines/chemokines in chronic periodontitis: A meta-analysis. *J Clin Periodontol.* v.43, p.727– 745, 2016.
- STAFFORD, G.; ROY, S.; HONMA, K.; SHARMA, A. Sialic acid, periodontal pathogens and *Tannerella forsythia*: stick around and enjoy the feast! *Molecular oral microbiology*, v. 27, n. 1, p. 11-22, 2012.
- STEWART, P.S. ; COSTERTON, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* v.358, n.9276, p.135-138, 2001.
- SZTUKOWSKA, M.N.; DUTTON, L.C.; DELANEY, C. et al. Community Development between *Porphyromonas gingivalis* and *Candida albicans* Mediated by InlJ and Als3. *mBio*, v. 9, n. 2, 2018.
- TADDEI, S.R.A. et al., Role of CCR2 in orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.* v. 141, n. 2, p. 153-160.e1, 2012.
- TAKAYANAGI, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *Journal of Periodontal Research*, v.40, p.287-293, 2005.
- TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*, v. 16, n. 1, p. 3–9, 2004.
- TAKEUCHI, H. et al. The serine phosphatase SerB of *Porphyromonas gingivalis* suppresses IL-8 production by dephosphorylation of NF- $\kappa$ B RelA/p65. *PLoS pathogens.* v. 9, n.4, 2013.
- TALBOT, J. et al. CCR2 Expression in Neutrophils Plays a Critical Role in Their Migration Into the Joints in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatology.* v. 67, n. 7, p. 1751–1759, 2015.
- TAYLOR, P.C.; WILLIAMS, R.O.; FELDMANN, M. Tumour necrosis factor  $\alpha$  as a therapeutic target for immune-mediated inflammatory diseases. v.15, n.6, p.557-563, 2004.



- TEZAL, M. et al. Supragingival plaque may modify the effects of subgingival bacteria on attachment loss. *Journal of periodontology*, v. 77, n. 5, p. 808–13, 2006.
- TRIBBLE, G. D. et al. A *Porphyromonas gingivalis* haloacid dehalogenase family phosphatase interacts with human phosphoproteins and is important for invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 103, n.29, 2006.
- TRINDADE, S.C. et al. Induction of interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-10, IL-8 and immunoglobulin G by *Porphyromonas gingivalis* HmuY in humans. v.47, n.1, p. 27-32, 2012.
- TSUCHIDA, S. et al. Ubiquitination in periodontal disease: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 7, p. 1–15, 2017.
- TSUKASAKI, M. et al. Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells. *Nat Commun*. v.9, n.701, 2018.
- TURNER, M.D. et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. v.1843, n.11, p.256- 2582, 2014.
- VAN COILLIE, E.; VAN DAMME, J.; OPDENAKKER, G. The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. v.10, n.1, p.61–86, 1999.
- VEITH, P.D. et al. *Porphyromonas gingivalis* Outer Membrane Vesicles Exclusively Contain Outer Membrane and Periplasmic Proteins and Carry a Cargo Enriched with Virulence Factors. *J. Proteome Res.*, v. 13, n. 5, p. 2420–2432, 2014.
- VERNAL, R. et al. Differential cytokine expression by human dendritic cells in response to different *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *J Clin Periodontol*, v. 36, p. 823–829, 2009.
- VOLEJNIKOVA, S et al. Monocyte recruitment and expression of monocyte chemoattractant protein-1 are developmentally regulated in remodeling bone in the mouse. *The American journal of pathology*. v.150, n.5, 1997.
- WADE, W. G. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research*, v. 69, n. 1, p. 137–143, 2013.
- WANG, L. et al. Oral lichen-planus-associated fibroblasts acquire myofibroblast characteristics and secrete pro-inflammatory cytokines in response to *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide stimulation. *BMC oral health*. v. 18, n.1, 2018.
- WU, Y. et al. *Porphyromonas gingivalis*-Induced MIF Regulates Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression in EA.hy926 Cells and Monocyte-Endothelial Cell Adhesion Through the Receptors CD74 and CXCR4. *Inflammation*. v.42, p.874–883, 2019.
- XU, X. WANG, Z. ZHANG, X. The human microbiota associated with overall health. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.35, n. 1, p.129-140, 2015.
- YILMAZ, Ö.; WATANABE, K.; LAMONT, R. J. Involvement of integrins in fimbriae-mediated binding and invasion by *Porphyromonas gingivalis*. *Cellular Microbiology*, v. 4, n. 5, p. 305–314, 2002.

YUCEL-LINDBERG, T.; BÅGE, T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. v. 15, 2013.

ZENG, Q. et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces over production of CC chemokine ligand 2 via toll-like receptor-4 in oral lichen planus. *Journal of oral pathology & medicine*, v. 47, n. 2, p. 166-172, 2018.

ZHANG, D.; CHEN, L.; LI, S.; GU, Z.; YAN, J. Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 production by THP-1 cells in away different from that of *Escherichia coli* LPS. *Innate Immunity*, v. 14, n. 2, p. 99 - 107, 2008.

ZHAO, H. et al. Variations in oral microbiota associated with oral cancer. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

ZHUANG, Z. et al. Induction of M2 Macrophages Prevents Bone Loss in Murine Periodontitis Models. *Journal of Dental Research*. v.98, n.2, p. 200–208, 2019.