

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

**PAPEL DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS
NA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA POR
Aggregatibacter actinomycetemcomitans
EM CAMUNDONGOS**

MILA FERNANDES MOREIRA MADEIRA

BELO HORIZONTE
2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

**PAPEL DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS
NA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA POR
Aggregatibacter actinomycetemcomitans
EM CAMUNDONGOS**

Tese 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 título de
Doutor em Ciências: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza
(Depto. de Microbiologia, ICB/UFMG)

Co-Orientadora: Profa. Dra. Tarcília Aparecida da Silva
(Depto. Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológica, FO-UFMG)

Aluna: Mila Fernandes Moreira Madeira

BELO HORIZONTE
2011

Locais de Execução

O presente trabalho foi desenvolvido nos seguintes laboratórios da UFMG, os quais apresentaram estrutura para o desenvolvimento das atividades descritas a seguir:

- Laboratório de Interação Microrganismo-Hospedeiro, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, sob responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Danielle da Glória de Souza, onde foram realizados os cultivos do microrganismo, dosagens de citocinas e quantificação de MPO nos tecidos periodontais.e os experimentos *in vitro* e *in vivo*.
- Laboratório de Patologia Experimental, Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas da Faculdade de Odontologia, sob responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Tarcília Aparecida da Silva. Neste laboratório foram realizadas as análises microscópicas dos espécimes, bem como a avaliação da perda óssea alveolar;
- Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, sob responsabilidade do Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira.

Alguns experimentos foram conduzidos no Centre National de La Recherche Scientifique (CNRS), em Órleans, França, durante o meu estágio de doutoramento, sob orientações dos professores Mauro Martins Teixeira e Bernhard Ryffel.

Colaborações:

Professor Dr. Mauro Martins Teixeira

Apoio Financeiro:

Este trabalho tem apoio financeiro da CAPES e CNPq.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não teria sido possível sem a colaboração de pessoas especiais e que foram inúmeras.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a sua realização.

Em especial gostaria de agradecer:

- À minha querida orientadora Danielle, nossa chefe, que me acolheu no universo inflamatório e me abriu as portas para um mundo de perguntas, mas também me ensinou a encontrar respostas e a ter prazer nesta busca. Obrigada pelo alto-astral diário, pelo sorriso único e pelo constante incentivo, inclusive nas escolhas mais difíceis. Obrigada por me ouvir sempre, por ser uma mais que minha orientadora e por me fazer acreditar que é possível.
- À minha querida co-orientadora Tarcília, presente desde o início, o meu elo às minhas raízes odontológicas. Obrigada pelo exemplo, pela disposição em ajudar, pelas discussões experimentais e pelas parcerias frutíferas. É sempre um prazer trabalhar com você!
- Ao querido Prof. Mauro Teixeira, nosso chefe! Tenho muito a te agradecer, principalmente por ser um exemplo. O convite que me fez para um estágio na França foi um divisor de águas em minha vida acadêmica! Chefe, obrigada pela oportunidade de respirar ciência, de ampliar horizontes e de querer melhorar sempre. O seu exemplo é contagiante e me faz acreditar que podemos fazer sempre de um jeito melhor.
- Ao Prof. Gustavo Garlet pelas dicas, pela boa vontade em ajudar e a esclarecer infinitas dúvidas. Obrigada mesmo!
- À Landa e Lívia Tavares, pela paciência em discutir Western Blot comigo. Um dia eu aprendo, prometo a vocês! Muito obrigada por tudo!
- Às amigas Rosana e Paty Campi que estão comigo desde o início e que tornam o dia-a-dia no laboratório quase familiar.

- Às minhas ex-estagiárias: Graciela, Jôice, Carla e Carolina! A ajuda de vocês foi fundamental, principalmente no período em que estive na França. Muito obrigada!
- À minha atual IC e futura mestranda Silvia, que literalmente me salvou! No meio a Pbs e MICs você encarou experimentos que nunca havia feito e me ajudou muito. Você é especial Silvinha, espero que nossa parceria seja longa!
- Ao meu amigo, companheiro acadêmico e de profissão, Celso. Os experimentos ficaram muito mais bem organizados com a sua chegada, os resultados foram surgindo e os papers foram escritos! Acho que o nosso time tá ficando bom!
- Aos amigos Flávio Amaral, Caio e Rodrigo Guabiraba que foram cúmplices em várias histórias pelo mundo. Obrigada pela amizade de vocês!
- A todos os amigos LIMHO: Vivian, Renata, Livinhas, Raquel, Talles, Luana, Zélia, Daniel, Tiça, Thiago, Cristiano, Fred, Ana Carol, Irla, Deborah, Lucas e Elisão. As risadas e histórias no laboratório são impagáveis!
- Aos amigos da Imunofarmacologia que são muitos, impossível citar todos sem me esquecer de algum.
- Aos amigos da FOUFMG (ou do Dental Club?): Janine, Silvana, Adriana, Davidson, Soraia e Jôice.
- À Gil, pela alegria e por deixar nossa vidraria sempre bem organizada (quando as reformas permitem).
- Aos meus pais e irmãos por compreenderem minha ausência e por me incentivarem sempre. Amo vocês!
- Não poderia deixar de agradecer ao meu querido marido Alan, sempre presente, incentivando, torcendo, sofrendo junto. Entendendo os momentos em que a distância é necessária. Obrigada por estar sempre junto a mim!

“Na vida, não vale tanto o
que temos, nem tanto importa
o que somos.
Vale o que realizamos com aquilo que
possuímos e, acima de tudo,
importa o que fazemos de nós!”

Chico Xavier

LISTA DE ABREVIações

AA: Ácido aracdônico

Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

ABC: *Alveolar bone crest*

A₅₆₀: Absorbância em 560 nm

BSA: *Bovine serum albumin* – albumina de soro bovino

CDT: *Citolethal Distending Toxin*

CeBio: Centro de Bioterismo da UFMG

COA: Crista óssea alveolar

cPLA₂: Fosfolipase A₂ citoplasmática

CysLT: cistenil-leucotrienos

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DNA: Ácido desoxirribonucléico

D.O: Densidade Óptica

DP: Doenças periodontais

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetracético

ELISA: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

FDC: *Forsyth Dental Center*

Ig: Imunoglobulina

IL: Interleucina

i.p.: intraperitoneal

IFN- γ : Interferon gama

JCE: Junção cimento-esmalte

KC: *Keratinocyte-derived chemokine*

kDa: Kilodaltons

KO: *knockout* – geneticamente deficiente para determinado gene

LPS: Lipopolissacarídeo

LTB: Leucotrieno B

M: Molar – unidade de medida de concentração

MCP-1: *Monocyte Chemoattractant Protein-1*

M-CSF : *Macrophage colony-stimulating factor* (Fator estimulador da colônia de macrófagos)

MIF: Fator inibidor da migração de macrófagos

MIF^{-/-}: Animais deficientes em MIF

MIP-1 α : *Macrophage inflammatory Protein-1 α*

MPO: Mieloperoxidase

MMP: Metaloproteinase de Matriz

MyD88: *myeloid differentiation primary response gene* (88)

ND: não detectável

NF κ B: Fator Nuclear κ B

NO: Óxido nítrico

NK: Células *natural killer*

OD: *optical density* – densidade óptica

OPD: *o-phenylenediamine dihydrochloride*

OPG: osteoprotegerina

PAF: Fator de Ativação de Plaquetas

PAFR: Receptor do fator de ativação de plaquetas

PAL: Periodontite Agressiva Localizada

PAMP: padrão molecular associado a patógenos

pb: Pares de bases

PBS: Tampão salina-fosfato

PCR: Reação em cadeia pela polimerase

pi: *post-infection* – pós-infecção

PMN: Polimorfonuclear

PGE-2: Prostaglandina E-2

qPCR: Reação em cadeia pela polimerase quantitativa ou em tempo real

RNA: Ácido ribonucléico

RNA_m: RNA mensageiro

RANTES: *Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*

RANK: Receptor ativador de NF κ B

RANKL: Ligante do receptor ativador de NF- κ B

RUNX2: *Runt-related transcription factor 2*

RTX: Toxina em repetição

SFB: *serum fetal bovine* – soro fetal bovino

Th: Linfócito T auxiliar

TIMPs: Inibidores Teciduais de Metaloproteinase

TIR: *Toll/Interleukin-1 receptor*

TLR: receptor do tipo *Toll*

TM: Tamanho molecular

TNF- α : Fator de necrose tumoral- α

TRAM: *TRIF-related adaptor molecule*

TRAP: *Tartrate-resistant acid phosphatase*

TRIF: *TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β*

TSA: *Tryptic Soy Agar*

TSB: *Tryptic Soy Broth*

UFC: Unidade Formadora de Colônia

WT: Animais do tipo selvagem

RESUMO

As doenças periodontais (DP) são doenças inflamatórias provocadas por microorganismos periodontopatogênicos como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), que podem causar destruição dos tecidos periodontais. A inoculação oral de camundongos com Aa ou a injeção de LPS de Aa (AaLPS) induz à perda óssea alveolar acentuada e à produção local de mediadores inflamatórios à semelhança da forma agressiva da DP em seres humanos. Entretanto, a sinalização de AaLPS, o papel de alguns mediadores como IL-12, MIF e mediadores lipídicos, tais como PAF e leucotrienos na reabsorção óssea alveolar durante as DP não são bem conhecidos. No presente estudo, reabsorção óssea alveolar foi induzida por injeções de AaLPS. A inoculação oral de Aa foi utilizada para indução de DP experimental em camundongos selvagens (WT) ou deficientes na produção de MIF (MIF^{-/-}), no receptor de PAF (PAFR^{-/-}) ou na produção de 5-LO (5-LO^{-/-}) pela. Nossos resultados mostram que a sinalização de AaLPS ocorre de maneira dependente de MyD88, culminando na perda óssea alveolar, provavelmente pela produção de TNF- α . Foi observado um infiltrado neutrofílico acompanhado de produção de mediadores inflamatórios e perda óssea alveolar após inoculação de Aa em camundongos selvagens, entretanto, na ausência de MIF, PAFR e 5-LO, os camundongos apresentaram reduzida perda de osso alveolar, quando comparado aos camundongos WT. Em camundongos MIF^{-/-} e 5-LO^{-/-} esse fenótipo foi associado à diminuição do acúmulo de neutrófilos. Camundongos WT, bem como PAFR^{-/-} submetidos à inoculação oral de Aa apresentaram acúmulo de neutrófilos e aumento dos níveis de CXCL-1 e TNF- α nos tecidos periodontais ao longo do período experimental. *In vitro*, AaLPS induziu maior atividade osteoclástica, a qual foi dependente de MIF. O bloqueio do PAF e da produção de 5-LO impediu a atividade de reabsorção de osteoclastos ativados por AaLPS. Em conclusão, MIF e 5-LO têm papel no controle da resposta inflamatória periodontal, contribuindo significativamente para a progressão da perda óssea alveolar e afetando diretamente a diferenciação e a atividade dos osteoclastos, enquanto PAF afeta

diretamente a ativação de osteoclastos, sem interferências na resposta inflamatória.

Palavras chaves: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, doenças periodontais, IL-12, MyD88, MIF, PAF, 5-lipoxigenase, LPS, perda óssea, camundongos.

ABSTRACT

Periodontal disease (PD) is a chronic inflammatory and alveolar bone destructive disease triggered by microorganisms as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*). Oral inoculation of mice with *Aa* or injections of its LPS (*Aa*LPS) induce marked alveolar bone loss and local production of inflammatory mediators as clinical aggressive forms of PD in humans. Perhaps, signaling involved in recognition of *Aa*LPS and the role of some mediators such as IL-12, MIF, lipidic mediators such as PAF and leukotrienes in alveolar bone resorption during PD is not well known. In the present study, experimental alveolar bone loss was induced by *Aa*LPS injections in wild-type (WT) mice and experimental PD was induced in WT or MIF (MIF^{-/-}), PAFR (PAFR^{-/-}) or 5-LO (5-LO^{-/-}) knockout mice through oral inoculation of *Aa*. Our results show that the signaling through MyD88 is important to alveolar bone loss induced by *Aa*LPS likely by activation of TNF- α production. Oral inoculation of *Aa* induced significant neutrophil influx, production of inflammatory mediators and alveolar bone loss in WT mice. Perhaps, in the absence of MIF, PAFR or 5-LO, mice had reduced alveolar bone loss when compared to WT mice. In MIF^{-/-} and 5-LO^{-/-} mice this phenotype was associated with decreased neutrophil accumulation. WT mice as well as PAFR^{-/-} mice submitted to oral inoculation of *Aa* presented neutrophil accumulation, increased levels of CXCL-1 and TNF- α in periodontal tissues. *In vitro*, *Aa*LPS enhanced osteoclastic activity in a MIF-dependent manner and the blockage of PAF and 5-LO impaired the resorption activity of *Aa*LPS-activated osteoclasts. In conclusion, MIF and 5-LO has role in controlling bacterial growth in the context of PD

contributing significantly to the progression of bone loss during PD by directly affecting differentiation and activity of osteoclasts and PAF directly affects osteoclasts activation without interferences in inflammatory response.

Key words: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, periodontal disease, IL-12, MyD88, MIF, PAF, 5-lipoxygenase, LPS, bone loss, inflammation, mice.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Patogênese das doenças periodontais.....	03
FIGURA 2: Controle da reabsorção óssea.....	11
FIGURA 3: Vias de sinalização dependente e independente de MyD88.....	15
FIGURA 4: Representação esquemática da produção de PAF e leucotrienos a partir de fosfolípidos de membrana.....	21
FIGURA 5: Biossíntese de leucotrienos.....	23

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	01
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL.....	25
3. TRABALHOS CIENTÍFICOS.....	28
3.1. A controversial role for IL-12 in immune response and bone resorption at apical periodontal sites.....	28
3.2. MyD88, but not TRIF, is essential for alveolar bone loss induced by LPS from <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> in mice.....	29
3.3. MIF induces osteoclast differentiation and contributes to progression of periodontal disease in mice.....	56
3.4. The role of PAF in <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> -induced periodontal disease in mice.....	57
3.5. The role of 5-LO in <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> -induced periodontal disease in mice.....	87
4. DISCUSSÃO.....	117
5. SUMÁRIO DE RESULTADOS.....	128
6. REFERÊNCIAS.....	129
ANEXOS.....	150

