UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Faculdade de medicina de Ribeirão preto Pós-graduação em imunologia básica e aplicada

PARTICIPAÇÃO DE CITOCINAS NA Imunomodulação da doença periodontal Experimental induzida por *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

GUSTAVO POMPERMAIER GARLE



RIBEIRÃO PRETO 2004

2 SALANA MANA

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

Participação de citocinas na imunomodulação da doença periodontal experimental induzida por *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

GUSTAVO POMPERMAIER GARLET

RIBEIRÃO PRETO 2004

GUSTAVO POMPERMAIER GARLET

Participação de citocinas na imunomodulação da doença periodontal experimental induzida por *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador : Prof. Dr. João Santana da Silva

Ribeirão Preto

2004

Trabalho realizado no Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da FAPESP (01/09998-7, 04/06731-8).

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de Ribeirão Preto / USP

Garlet, Gustavo Pompermaier

Participação de citocinas na imunomodulação da doença periodontal experimental induzida por *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Ribeirão Preto, 2004.

183 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Silva, João Santana.

1. Doença periodontal 2. Actinobacillus actinomycetemcomitans

3. Imunomodulação 4. Citocinas

EPÍGRAFE

Dr. Jekyll e Mr. Hyde

(A participação de citocinas na imunomodulação das doenças periodontais)

O fog sobrevoava lento, asfixiando a cidade; e trespassando as camadas opressoras deste sufocante nevoeiro, a vida estendia-se...

Se o misterioso Edward Hyde e o respeitado Henry Jekyll fossem investigados, é de se esperar que revelassem muitos segredos. Havia algo de anormal e surpreendente em suas essências, de forma que a meu interesse em sua natureza foi adicionada uma curiosidade quanto à sua origem, sua vida, seu destino.

E, aconteceu que a direção de meus estudos científicos despertou a consciência da perene guerra entre suas duas naturezas: o bem e o mal. Embora fosse paradoxal, eram reais. A maldição foi a de que esses ramos incompatíveis ficassem fortemente amarrados um ao outro. Se cada um deles pudesse, ao menos se localizar numa identidade diferente. Como então, dissociá-los?

Porém, esse negócio de ficar fazendo perguntas parece muito com o juízo final. Começa-se com uma pergunta, e é como rolar uma pedra. Você se senta tranqüilamente no topo de uma colina, e lá se vai a pedra, arrastando outras consigo; e, de repente, algum gentil velhote é atingido na cabeça em seu próprio quintal.

> Adaptado de: O Médico e o Monstro (Dr. Jekyll and Mr. Hyde) Robert Louis Stevenson, 1886

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Anselmo e Rosa...

Ao meu irmão Thiago...

À Ana Paula...

...simplesmente, por tudo!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva, pela sua competência, espírito científico e dedicação à pesquisa... mas principalmente pela sua confiança e amizade.

Aos Profs. Dr. Ademilson Panunto Castelo (FMRP-USP), Auro Nomizo (FCFRP-USP) Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior (FOP-UNICAMP) e Dra Walderez Ornelas Dutra (UFMG) pela atenção dispensada, comentários e sugestões na correção da proforma desta dissertação, e pela participação na banca.

Ao Prof. Dr. Mário Julio Ávila Campos, do Laboratório de Anaeróbios do ICB-USP, que desde meu mestrado tem colaborado com nosso grupo, fornecendo as cepas de periodontopatógenos utilizadas no desenvolvimento de nossos estudos.

Ao Profs. Dr. Fernando Queiroz Cunha (FMRP-USP), Marcos Rossi (FMRP-USP) e Benedito Antonio Lopes da Fonseca (FMRP-USP), e suas técnicas Maria Elena, Giuliana e Fabíola, pela disponibilidade na utilização da infra-estrutura de seus laboratórios e pelo auxílio em diversos experimentos.

Ao curso de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, representado pelos seus Professores, pelos ensinamentos e pela dedicação que fez com que nosso curso atingisse o nível de excelência em que se encontra.

À Ana Cristine S. Ferreira, secretária da Pós-Graduação, que desde meu primeiro telefonema para Ribeirão Preto se mostrou sempre disposta e atenciosa: pela sua amizade, apoio e competência profissional; e pela sua dedicação ao nosso curso de pós-graduação e a seus alunos.

Aos funcionários do Biotério: Júlio, Cris, Rubinho, Sávio, Edinelson, cuja contribuição é imprescindível para a realização de nossos estudos.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia, que direta ou indiretamente contribuem para o bom andamento do nosso dia a dia.

As Profas Dra Beatriz Rosseti Ferreira e Dra Isabel Miranda, pelos ensinamentos, por sua amizade e atenção.

A todos os colegas de laboratório, que me receberam de braços abertos e dispostos a ensinar, Gislaine, Fabiana, Ana Paula Campanelli, Lucy, Jane, Márcia, Homero, Karen, Cristiane, Wander e Alexandra; e aos que ao longo destes anos foram se juntando ao grupo: Ana Paula Moreira, Luciano, Cristina, Marcelo, Vanessa, Mara Rúbia, Natália, Flávia, Fredy, Elisa, Alessandra, Cláudia, Daniela, Carlo, Antonio, Wanessa, pela convivência pela amizade e companheirismo.

A todos os colegas de pós-graduação, pelas discussões científicas no nosso JournalClub e nos Workshops, pelos momentos de descontração nas festas e churrascos... e aos que também participavam das atividades mais esperadas da semana: squash e futebol, nossos momentos de exorcismo dos experimentos que não davam certo, tubos trocados, cortes que se desprendem das lâminas, das amplificações inespecíficas, etc, etc...

A FAPESP, cujo auxílio na forma de minha bolsa de doutorado (01/09998-7) e de auxílio pesquisa (04/06731-8), possibilitaram a realização desta tese.

...Muito obrigado a todos!

Participação de citocinas na imunomodulação da doença periodontal experimental induzida por Actinobacillus actinomycetemcomitans

Índice

1. INTRODUÇÃO 04 **2. OBJETIVOS** 15 **3. MATERIAIS E MÉTODOS** 3.1. Animais de experimentação 16 3.2. Protocolo de indução de doença periodontal 16 3.3. Coleta de amostras 17 3.4. Avaliação da reabsorção óssea alveolar. 19 3.5. Análise histopatológica. 20 21 3.6. Análise quantitativa e qualitativa do infiltrado inflamatório. 3.7. Extração de RNA e transcrição reversa 22 3.8. Reações de RealTimePCR 23 3.9. Detecção e quantificação de A. actinomycetemcomitans e P. gingivalis 25 3.10. Dosagem de citocinas por ELISA 27 3.11. Análise qualitativa e semi-quantitativa dos níveis de proteína C reativa (CRP) 28 29 3.12. Dosagem de mieloperoxidase (MPO) 3.13. Dosagem de anticorpos 30 3.14. Análise estatística 31 4. RESULTADOS 32 4.1. Quantificação da reação inflamatória e perda óssea alveolar induzida por A. actinomycetemcomitans 4.2. Análise histopatológica dos tecidos periodontais de camundongos infectados com A. actinomycetemcomitans 32 4.3. Análise fenotípica dos leucócitos extraídos dos tecidos periodontais de camundongos infectados com A. actinomycetemcomitans 35 4.4. Cinética de expressão de citocinas tecidos periodontais de camundongos infectados com A. 37 actinomycetemcomitans 4.5. Cinética de expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas nos tecidos periodontais de 39 camundongos infectados com A. actinomycetemcomitans 4.6. Cinética de expressão de metaloproteases (MMPs) e seus inibidores (TIMPs) nos tecidos periodontais de camundongos infectados com A. actinomycetemcomitans 44 4.7. Cinética de expressão de RANKL e OPG nos tecidos periodontais de camundongos infectados com A. actinomycetemcomitans 45 4.8. Análise de correlação entre os níveis de expressão de MMP, TIMPs, RANKL e OPG, com a expressão

de citocinas durante o curso da doença periodontal experimental

48

4.9. Quantificação de A. actinomycetemcomitans nos tecidos periodontais durante o curso da doença	
periodontal experimental	50
4.10. Efeitos sistêmicos da infecção por A. actinomycetemcomitans durante o curso da doença periodontal	
experimental	50
4.11. Níveis de iNOS nos tecidos periodontais de camundongos infectados com A. actinomycetemcomitans	52
4.12. Níveis de mieloperoxidase (MPO) nos tecidos periodontais de camundongos infectados com A.	
actinomycetemcomitans	52
4.13. Detecção quantificação de anticorpos específicos para A. actinomycetemcomitans no soro dos	
camundongos infectados durante o curso da doença periodontal experimental	54
4.14. Papel do TNFp55 na modulação da reação inflamatória e perda óssea alveolar induzida por A.	
actinomycetemcomitans	54
4.15. Papel de TNFp55 na migração celular para os tecidos periodontais de camundongos infectados com	
A. actinomycetemcomitans	55
4.16. Papel de TNFp55 na modulação da expressão de citocinas nos tecidos periodontais de camundongos	
infectados com A. actinomycetemcomitans	59
4.17. Papel de TNFp55 na modulação da expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas nos	
tecidos periodontais de camundongos infectados com A. actinomycetemcomitans	61
4.18. Papel de TNFp55 na modulação da expressão de metaloproteases (MMPs), RANKL e seus	
respectivos inibidores (TIMPs e OPG) nos tecidos periodontais de camundongos infectados com A.	65
actinomycetemcomitans	
4.19. Papel do TNFp55 na modulação da infecção experimental por A. actinomycetemcomitans	69
4.20. Papel do TNFp55 na modulação de fatores antimicrobianos durante o curso da doença periodontal	
experimental induzida por A. actinomycetemcomitans	71
4.21. Papel do IFN- γ e IL-12 na modulação da reação inflamatória e perda óssea alveolar induzida por A.	
actinomycetemcomitans	71
4.22. Papel de IFN-γ e IL-12 na modulação da migração celular para os tecidos periodontais de	
camundongos infectados com A. actinomycetemcomitans	73
4.23. Papel de IFN-γ e IL-12 na modulação da expressão de citocinas nos tecidos periodontais de	
camundongos infectados com A. actinomycetemcomitans	77
4.24. Papel de IFN-γ e IL-12 na modulação da expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas nos	0.0
tecidos periodontais de camundongos infectados com A. actinomycetemcomitans	80
4.25. Papel de IFN-γ e IL-12 na modulação da expressão de metaloproteases (MMPs), RANKL e seus	
respectivos inibidores (TIMPs e OPG) nos tecidos periodontais de camundongos infectados com A.	81
actinomycetemcomitans	84 80
4.26. Papel do IFN-γ e IL-12 na modulação da infecção experimental por <i>A. actinomycetemcomitans</i>	09
4.27. Papel de IFN- γ e IL-12 na modulação dos efeitos sistêmicos da infecção por A.	92
actinomycetemcomitans	12
4.28. Papel de IFN-γ e IL-12 na modulação de fatores antimicrobianos durante o curso da doença	
periodontal experimental induzida por A. actinomycetemcomitans	94

4.29. Papel de iNOS no controle da infecção experimental por A. actinomycetemcomitans	96
4.30. Papel de IL-4 e IL-10 na modulação da reação inflamatória e perda óssea alveolar induzida por A.	
actinomycetemcomitans	98
4.31. Papel de IL-4 e IL-10 na modulação da migração celular para os tecidos periodontais de	
camundongos infectados com A. actinomycetemcomitans	102
4.32. Papel de IL-4 e IL-10 na modulação da expressão de citocinas nos tecidos periodontais de	
camundongos infectados com A. actinomycetemcomitans	102
4.33. Papel de IL-4 e IL-10 na modulação da expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas nos	
tecidos periodontais de camundongos infectados com A. actinomycetemcomitans	106
4.34. Papel de IL-4 e IL-10 na modulação da expressão de metaloproteases (MMPs), RANKL e seus	
respectivos inibidores (TIMPs e OPG) nos tecidos periodontais de camundongos infectados com A.	
actinomycetemcomitans	111
4.35. Papel do IL-4 e IL-10 na modulação da infecção experimental por A. actinomycetemcomitans	113
4.36. Papel de IL-4 e IL-10 na modulação de fatores antimicrobianos durante o curso da doença	
periodontal experimental induzida por A. actinomycetemcomitans	114
5. DISCUSSÃO	117
6. CONCLUSÕES	151
7. RESUMO	153
8. ABSTRACT	154
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	155
10. ANEXOS	
10.1. Parecer da comissão de ética em experimentação animal	178
10.2. Seqüências dos primers, propriedades da reação e do produto de amplificação	179
10.3. Análise da curva de dissociação para determinação da especificidade da reação de amplificação	
através de RealTimePCR	181
10.4. Análise quantitativa da expressão de mRNA através de RealTimePCR	182
10.4. Análise quantitativa da expressão de mRNA através de RealTimePCR10.5. <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> -induced periodontal disease in mice: patterns of cytokines,	182
 10.4. Análise quantitativa da expressão de mRNA através de RealTimePCR 10.5. <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> -induced periodontal disease in mice: patterns of cytokines, chemokines and chemokine receptors expression and leukocyte migration - Manuscrito aceito para 	182
 10.4. Análise quantitativa da expressão de mRNA através de RealTimePCR 10.5. <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> -induced periodontal disease in mice: patterns of cytokines, chemokines and chemokine receptors expression and leukocyte migration - Manuscrito aceito para publicação no periódico <i>Microbes and Infection</i> 	182 183
 10.4. Análise quantitativa da expressão de mRNA através de RealTimePCR 10.5. <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> -induced periodontal disease in mice: patterns of cytokines, chemokines and chemokine receptors expression and leukocyte migration - Manuscrito aceito para publicação no periódico <i>Microbes and Infection</i> 10.6. Cytokine profile regulates the expression of matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors 	182 183
 10.4. Análise quantitativa da expressão de mRNA através de RealTimePCR 10.5. <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> -induced periodontal disease in mice: patterns of cytokines, chemokines and chemokine receptors expression and leukocyte migration - Manuscrito aceito para publicação no periódico <i>Microbes and Infection</i> 10.6. Cytokine profile regulates the expression of matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors expression and modulates the progression of experimental periodontal disease in 	182 183
 10.4. Análise quantitativa da expressão de mRNA através de RealTimePCR 10.5. <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> -induced periodontal disease in mice: patterns of cytokines, chemokines and chemokine receptors expression and leukocyte migration - Manuscrito aceito para publicação no periódico <i>Microbes and Infection</i> 10.6. Cytokine profile regulates the expression of matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors expression and modulates the progression of experimental periodontal disease in mice – Manuscrito em preparação 	182 183 189
 10.4. Análise quantitativa da expressão de mRNA através de RealTimePCR 10.5. <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> -induced periodontal disease in mice: patterns of cytokines, chemokines and chemokine receptors expression and leukocyte migration - Manuscrito aceito para publicação no periódico <i>Microbes and Infection</i> 10.6. Cytokine profile regulates the expression of matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors expression and modulates the progression of experimental periodontal disease in mice – Manuscrito em preparação 10.7. The role of TNF-α in the determination of experimental periodontitis severity and in the control of 	182 183 189
 10.4. Análise quantitativa da expressão de mRNA através de RealTimePCR 10.5. <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> -induced periodontal disease in mice: patterns of cytokines, chemokines and chemokine receptors expression and leukocyte migration - Manuscrito aceito para publicação no periódico <i>Microbes and Infection</i> 10.6. Cytokine profile regulates the expression of matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors expression and modulates the progression of experimental periodontal disease in mice – Manuscrito em preparação 10.7. The role of TNF-α in the determination of experimental periodontitis severity and in the control of <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> infection – Manuscrito em preparação 	182 183 189 194

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Actinobacillus actinomycetemcomitans
AR	Artrite reumatóide
CCR	Receptor de quimiocina da família CC
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
COA	Crista óssea alveolar
CRP	Proteína C reativa (C reactive protein)
CXCR	Receptor de quimiocina da família CXC
DP	Doença periodontal
ELISA	Ensaio imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
FACS	Citômetro de fluxo (fluorescence activated cell sorter)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (Fluorescein isothiocyanate)
FSC	Parâmetro de análise celular por tamanho (forward scatter)
IFN	Interferon
IL	Interleucina (interleukin)
iNOS	Enzima óxido nítrico sintetase induzível (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
JAC	Junção amelo cementária
КО	Animal geneticamente deficiente (Knock-Out)
LPS	Lipopolissacarídeo
MMP	Metaloprotease de matriz (matrix metalloproteinase)
MPO	Mieloperoxidase (myeloperoxidase)
mRNA	Acido ribonucléico mensageiro
NFkB	Fator nuclear κ B (<i>nuclear factor</i> κ B)
NK	Células "Natural Killer"
NO	Óxido nítrico (nitric oxide)
OPG	Osteoprotegerina (osteoprotegerin)
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)
PE	Ficoeritrina (phycoeritrin)
PI	Pós-infecção
PG	Porphyromonas gingivalis
RANK	Eeceptor ativador do NFkB (receptor activator of NFkB)
RANKL	Ligante do receptor ativador do NFkB (<i>receptor activator of NFkB ligand</i>)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (CONT.)

RealTimePCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RT	Transcrição reversa (reverse transcription)
SD	Desvio padrão (Standard deviation)
SSC	Parâmetro de análise celular em citometria de fluxo por granulosidade (<i>side scatter</i>)
Th	Linfócito T auxiliar (T helper lymphocyte)
TIMP	Inibidor tecidual de metaloprotease (tissue inhibitor of metalloproteinase)
TNF	Fator de Necrose Tumoral (Tumor Necrosis Factor)
UAA	Unidade arbitrária de área
WT	Camundongo selvagem (<i>Wild-Type</i>)

INTRODUÇÃO

The providence of the second of the second

1. INTRODUÇÃO

As doenças periodontais (DPs), alterações inflamatórias crônicas dos tecidos de sustentação dos órgãos dentais, têm sua etiologia relacionada ao biofilme bacteriano aderido à superfície dental (GENCO 1992, LOESCHE 1993, ADA 1998, KINANE & LAPPIN 2001). Em termos epidemiológicos, as diferentes modalidades de DP atingem praticamente a totalidade da população, sendo a patologia óssea mais prevalente em humanos e importante causa de perda dental entre adultos. Atualmente, as DPs tem sido descritas como fatores modificadores da saúde sistêmica dos pacientes (AAP 1996, PAGE 1998, AAP 1999, EBERSOLE & CAPPELLI 2000, SUSIN *et al.* 2004).

Mesmo em condições clínicas de saúde, os tecidos periodontais estão em confronto contínuo com microrganismos potencialmente patogênicos, e até certo ponto, convivem eficazmente com estas agressões. Porém, na ausência ou inefetividade de medidas de controle de placa, começam a ocorrer alterações no microambiente do biofilme. Dessa forma, os tecidos periodontais do hospedeiro se encontram em íntima associação com uma crescente diversidade e quantidade de produtos microbianos no sulco gengival, surgindo então os sinais clínicos de doença (GENCO 1992, KINANE & LAPPIN 2001, YAMAZAKI et al. 2003, **GEMMEL** & SEYMOUR 2004). de microrganismos Embora а presença periodontopatogênicos seja fundamental para o início do desenvolvimento de doença, tem-se mostrado que a amplificação e progressão desse processo são altamente dependentes da resposta imune e inflamatória gerada pelo hospedeiro em resposta às bactérias ou a seus produtos (KINANE & LAPPIN 2001, TENG 2003, GEMMELL & SEYMOUR 2004).

Embora tal resposta supostamente proteja o hospedeiro da invasão microbiana em larga escala, a relativa inacessibilidade dos leucócitos e de fatores antimicrobianos aos microrganismos no sulco gengival, somada à proteção conferida por sua organização na forma de biofilme, inviabilizam a eliminação dos agentes infecciosos (EBERSOLE & TAUBMAN 1994, PAGE 1998, EBERSOLE *et al.* 2001, SOCRANSKY *et al.* 2002, SBORDONE *et al.* 2003). Além disso, acredita-se que a presença de diversos microrganismos com grande capacidade de invasão tecidual nos tecidos periodontais propicie acesso a sua disseminação pelo organismo. De fato, estudos recentes têm demonstrado que pacientes com DP apresentam uma marcante resposta sistêmica de fase aguda, a qual é controlada após o tratamento periodontal (SLADE *et al.* 2000, NOACK *et al.* 2001, MATTILA *et al.* 2002,

D'AIUTO *et al.* 2004). Tal resposta supostamente estaria envolvida na alteração da saúde sistêmica apresentada pelos pacientes com DP. Apesar de certa controvérsia, diversos estudos tem demonstrado que DP leva a predisposição, agravamento e até mesmo a ocorrência de diversas patologias, como aterosclerose, parto prematuro, infecções respiratórias e até mesmo a morte (EBERSOLE & CAPPELLI 2000, CRAIG *et al.* 2003, LALLA *et al.* 2003, IDE *et al.* 2004). Modelos experimentais de DP tem reforçado tal hipótese, demonstrando que a infecção por diferentes periodontopatógenos pode apresentar significantes efeitos sistêmicos (GIBSON FC 3RD *et al.* 2004, LALLA *et al.* 2003, HAN *et al.* 2004, STERN *et al.* 2004). Em conjunto, esses trabalhos nos levam a questionar o grau de proteção conferido ao hospedeiro pela resposta imune e inflamatória frente à infecção dos tecidos periodontais. Entretanto, os mecanismos envolvidos no controle da infecção periodontal, assim como seu grau de influência na saúde sistêmica do hospedeiro, ainda são pobremente conhecidos.

Controvérsias à parte, um fato concreto é que a permanência de um foco infeccioso em íntima associação aos tecidos periodontais leva a manutenção de uma reação inflamatória crônica local. Tal resposta leva a destruição tecidual através de mecanismos que incluem a produção de enzimas envolvidas na degradação de tecido conjuntivo e da expressão de fatores de diferenciação e ativação de osteoclastos (BAKER 2000, GRAVES & COCHRAN 2003, TENG et al. 2003). Dentre as proteases envolvidas na degradação e remodelação de proteínas da matriz extracelular, estão as metaloproteases de matriz (MMPs), as quais desempenham tal papel tanto em processos fisiológicos como patológicos. As MMPs são uma família de proteases cuja atividade é dependente de zinco e/ou cálcio, e são divididas em 4 subclasses com base na especificidade de seus substratos: colagenases, como a MMP-1 ou colagenase interstiticial, ativa contra colágeno fibrilar; gelatinases, também chamadas de colagenases do tipo IV (A ou MMP-2, e B ou MMP-9), que apresentam alta atividade contra colágeno desnaturado; estromalisinas, que degradam componentes de natureza não colágena presentes na matriz extracelular; e metaloproteases de membrana (BIRKEDAL-HANSEN et al. 1993, WERB 1997). A ativação das MMPs é regulada por um grupo de proteínas endógenas, chamado de inibidores teciduas de metaloproteases (TIMPs), capazes de inibir praticamente todos os membros da família das MMPs, de forma não específica (BAKER 2002). Em condições fisiológicas, os TIMPs estão em balanço com as MMPs, sendo a matriz extracelular remodelada de forma extremamente controlada. Contudo, em diversos estados patológicos, se verifica a elevação dos níveis de MMPs sem o concomitante aumento na expressão dos TIMPs, aumentando a atividade proteolítica e levando a destruição tecidual (DEAN et al.

1989, MURPHY *et al.* 1991, REYNOLDS *et al.* 1996, NAWROCKI *et al.* 1997, LI *et al.* 2000, PARSONS *et al.* 2004). Por outro lado, a elevação dos níveis de TIMPs, ou dimuição dos níveis de MMPs, também está associada a processos patológicos, como por exemplo, a quadros de fibrose (IREDALE *et al.* 1997).

Diversas MMPs são identificadas em tecidos periodontais (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-13, MT-1MMP) (KUBOTA et al. MMP-9, 1996, TERVAHARTIALA et al. 2000, SEGUIER et al. 2001, KIILI et al. 2002, ACHONG et al. 2003, EJEIL et al. 2003, SMITH et al. 2004, CESAR NETO et al. 2004) e no fluido gengival (MMP-1, MMP-2, MMP-3 MMP-8, MMP-13)(ALPAGOT et al. 2001, KIILI et al. 2002, TUTER et al. 2002, GRAYSON et al. 2003, REDDY et al. 2003, KINANE et al. 2003, EMINGIL et al. 2004), sendo encontradas em baixos níveis em tecidos normais, e altas concentrações são verificadas em tecidos inflamados (ALPAGOT et al. 2001, KINANE et al. 2003, SMITH et al. 2004). Diversos TIMPs também são encontrados em tecidos periodontais (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3) (KUBOTA et al. 1996, SEGUIER et al. 2001, REDDY et al. 2003), no fluido gengival (TIMP-1, TIMP-2) (NOMURA et al. 1998, ALPAGOT et al. 2001, TUTER et al. 2002), assim como são produzidos por fibroblastos gengivais in vitro (TIMP-1, TIMP-2) (KUT-LASSERRE et al. 2001). Dessa forma, acredita-se que MMPs e TIMPs estejam envolvidos no "turnover" fisiológico dos tecidos periodontais, assim como na destruição tecidual vista nas DPs (BIRKEDAL-HANSEN et al. 1993, REYNOLDS et al. 1994, VAN DER ZEE et al. 1997, GOLUB et al. 2001, EMINGIL et al. 2004, BJORNSSON et al. 2004, REDDY et al. 2003, EJEIL et al. 2003, RAMAMURTHY et al. 2002). Contudo, os estudos a respeito do balanço entre MMPs e TIMPs em tecidos periodontais doentes e saudáveis são contraditórios (DAHAN et al. 2001, NOMURA et al. 1998, AIBA et al. 1996, INGMAN et al. 1996, KUBOTA et al. 1996, GARLET et al. 2004, ALPAGOT et al. 2001), e a contribuição de tais moléculas para a patogênese das DPs não é completamente conhecida.

Além da destruição de tecido conjuntivo, a reabsorção óssea alveolar é um evento chave nas DPs. A integridade do tecido ósseo depende da manutenção de um delicado equilíbrio entre a rebsorção óssea pelos osteoclastos e a formação óssea pelos osteoblastos. RANKL (ligante do receptor de ativação do fator nuclear κB), seu receptor celular RANK (receptor de ativação do fator nuclear kB), e osteoprotegerina (OPG), que atua como seu receptor "decoy" de RANKL, foram recentemente identificados como os componentes moleculares do sistema de remodelação óssea. A ligação de RANKL a RANK, expresso nos precursores de osteoclastos, é o principal evento estimulatório para sua diferenciação e posterior ativação. Os efeitos de RANKL são regulados pela OPG, que inibe a reabsorção óssea impedindo a interação entre RANK e RANKL (TEITELBAUM 2000, KATAGIRI & TAKAHASI 2002). Assim como previamente descrito para o sistema MMPs/TIMPs, alterações no balanço da expressão de RANKL e OPG estão relacionados como componentes chave na patogênese de diversas patologias ósseas (RODAN & MARTIN 2000, SEZER *et al.* 2002, ROMAS *et al.* 2002). Com relação as DPs, estudos recentes tem demonstrado que níveis elevados de RANKL são encontrados no fluido gingival e no tecido periodontal em condições de doença. Tais estudos também sugerem que o balanço entre RANKL e OPG supostamente determina a atividade da doença (TENG 2000, CROTTI *et al.* 2003, LIU *et al.* 2003, GARLET *et al.* 2004, MOGI *et al.* 2004).

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

Provavelmente o conhecimento mais bem estabelecido com relação à patogênese das DPs esteja relacionado ao papel de citocinas inflamatórias clássicas, dentre as quais se destaca o TNF- α (GENCO 1992, BAKER 2000, KINANE & LAPPIN 2001, SEYMOUR & GEMMEL 2001). O TNF- α age em diversos passos nos mecanismos de recrutamento de leucócitos, induzindo o aumento da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e em leucócitos; e estimulando a produção local de quimiocinas, que por sua vez, atuam na manutenção e/ou na amplificação da reação inflamatória local (OFFENBACHER *et al.* 1989, JIANG *et al.* 1999, GRAVES & COCHRAM 2003, GRAVES & JIANG 1995). Além disso, o TNF- α participa diretamente da estimulação da imunidade inata e da atividade bactericida de fagócitos (DINARELLO 1990, DINARELLO *et al.* 2000, PFIZENMAIER *et al.* 1996). Dessa forma, o TNF- α apresenta importante papel na resistência a infecções por diversos patógenos (FERRANTE *et al.* 1992, GRAVES *et al.* 2000). Os efeitos inflamatórios e antimicrobianos

do TNF- α são mediados por seu receptor p55 (TNFRp55), enquanto o outro receptor de TNF- α , p75, atua no sentido de atenuar tal resposta inflamatória (AMAR *et al.* 1995, PESCHON *et al.* 1998).

Embora o TNF- α apresente papel essencial na iniciação e efetuação das respostas imune e inflamatória, diversos estudos têm demonstrado que a expressão inadequada de tal citocina pode levar a um significante dano colateral ao hospedeiro. De fato, TNF- α apresenta um evidente papel na patogênese de diversas doenças autoimunes e inflamatórias, como a artrite reumatóide (AR) (STASHENKO *et al.* 1987, RIDDERSTAD *et al.* 1991, HENDERSON *et al.* 1994, FEGHALI *et al.* 1997, DINARELLO *et al.* 2000). A inibição de TNF- α na AR leva a um menor recrutamento de células para o sítio de inflamação, regulação negativa da expressão de citocinas pro-inflamatórias e MMPs no tecido sinovial, além de significante redução na reabsorção óssea (TAK *et al.* 1996, GOLDRING *et al.* 2000, ULFGREN AK 2000). Estudos demonstram que a AR compartilha com as DPs aspectos como a natureza crônica da resposta inflamatória, a intensa destruição tecidual e reabsorção óssea. Além disso, verifica-se uma interessante associação entre DP e AR, uma vez que uma maior prevalência e maior severidade das DPs são verificadas nos pacientes com AR (MERCADO *et al.* 2001, MERCADO *et al.* 2003, HENDERSON *et al.* 2003, MIRANDA *et al.* 2003).

Com relação as DPs, TNF-α tem sido identificado em altos níveis em lesões peridontais (MATSUKI *et al.* 1992, STASHENKO *et al.* 1991, WANG *et al.* 2003, GORSKA *et al.* 2003, GRAVES & COCHRAM 2003) e no fluido gengival de pacientes com DP (ENGEBRETSON *et al.* 1999, ROSSOMANDO *et al.* 1990). De forma similar, o receptor p55 é amplamente expresso em tecidos periodontais inflamados (TERVAHARTIALA *et al.* 2001). Além disso, polimorfismos no gene de TNF-α tem sido relacionados à maior severidade da DP em diferentes populações (FASSMANN *et al.* 2003, SOGA *et al.* 2003). De fato, em modelos experimentais de DP, o TNF-α está envolvido na migração de leucócitos aos tecidos periodontais, na reabsorção óssea alveolar e na perda de inserção conjuntiva (ASSUMA *et al.* 2001). Contudo, apesar da clara demonstração da relação causa-efeito de TNF-α na patogênese da DP experimental, os mecanismos moleculares pelos quais tal citocina modula a resposta inflamatória e a severidade da doença não são conhecidos. Além disso, o potencial papel de TNF-α no controle da infecção periodontal permanece incógnito.

Uma das possíveis vias de regulação da resposta inflamatória nas DPs seria a produção de citocinas pelas diferentes subpopulações de linfócitos T auxiliares (ou T "helper": Th), que

atuariam atenuando ou potencializando a reação inflamatória nos tecidos periodontais, e desta forma, determinando a atividade ou latência das DPs (YAMAZAKI *et al.* 2003, TENG 2003, GEMMEL & SEYMOUR 2004, BAKER *et al.* 2001, BERGLUNDH *et al.* 2002). As respostas mediadas por linfócitos Th podem exibir um padrão Th1, que consiste predominantemente de uma resposta imune celular e pró-inflamatória, ou um padrão do tipo Th2, com características anti inflamatórias e de resposta imune predominantemente humoral. Tal polarização é determinada por citocinas típicas de cada padrão, envolve a participação quimiocinas e tipos celulares característicos, e determina o prognóstico e o curso de diversas doenças infecciosas, inflamatórias e autoimunes (ABBAS *et al.* 1996, MOSMANN & COFFMAN 1989, JANKOVIC *et al.* 2001).

A polarização de linfócitos "naive" para um padrão Th1 é primariamente dependente da produção de IL-12 por células apresentadoras de antígeno, especialmente pelas células dendríticas. Além de determinar uma resposta imune adaptativa do tipo celular, a IL-12 induz a produção de IFN- γ por células NK, células dendríticas e macrófagos, sendo um importante fator de regulação da resposta imune inata (BASTOS *et al.* 2004). Contudo, estudos recentes demonstram que na ausência de IL-12, outras citocinas como a IL-23 (pertencente à família da IL-12) ou a IL-18 também são capazes de induzir a produção de IFN- γ e a polarização de linfócitos Th1 (NAKANISHI *et al.* 2001, BROMBACHER *et al.* 2003, SZABO *et al.* 2003).

Após a polarização, as células Th1 passam a expressar receptores de quimiocinas característicos, como CXCR3 e CCR5, tornando-as responsivas a quimiocinas como CCL3 e CXCL10 (ROSSI & ZLOTNIK 2001, SCHRUM *et al.* 1996, SALLUSTO *et al.* 1998). Além disso, as células Th1 se tornam capazes de secretar a prototipica característica citocina Th1, IFN- γ (BROMBACHER *et al.* 2003, SZABO *et al.* 2003). O IFN- γ apresenta diversos efeitos no sistema imune, sendo a principal citocina ativadora de macrófagos, estimulando a fagocitose, captação e apresentação de antígenos, produção de citocinas inflamatórias e mediadores antimicrobianos, como o óxido nítrico (NO) (O'GARRA *et al.* 1989, SZABO *et al.* 2003, BOGDAN *et al.* 2001, BOGDAN *et al.* 2000). Desta forma, no desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1, que apresenta um papel crítico na imunidade protetora contra diversos patógenos intracelulares, a IL-12 atua basicamente como indutora da polarização, enquanto o IFN- γ pode ser considerado a citocina efetora desse padrão de resposta imune (BOGDAN *et al.* 2001, VAN DER VEEN *et al.* 2001, COOPER *et al.* 2002, SZABO *et al.* 2003, CHAKRAVORTTY & HENSEL 2003).

Com relação as DPs, tanto IFN-γ quanto IL-12 têm sido identificados em lesões periodontais e considerados como fatores potencialmente envolvidos na patogênese da doença (TOKORO *et al.* 1997, ROBERTS *et al.* 1997, LAPPIN *et al.* 2001, UKAI *et al.* 2001, BERGLUNDH *et al.* 2002). A expressão de IL-12 tem sido verificada em tecidos periodontais inflamados (SALVI *et al.* 1998, YAMAZAKI *et al.* 1997, GEMMELL *et al.* 1998, ROBERTS *et al.* 1997). Além disso, IL-12 é produzida por células dendríticas e monócitos estimulados com periodontopatógenos (KOBAYASHI *et al.* 2000, JOTWANI *et al.* 2001, KIKUCHI *et al.* 2004, JOTWANI *et al.* 2004), e citada como fator potencialmente envolvido na patogênese da DP, porém, sem afirmações a respeito de ser um fator positivo ou negativo na progressão da doença.

O IFN-y parece ser a principal citocina produzida por células T na DP, e diversos estudos têm demonstrado uma associação entre IFN-y e lesões progressivas ou formas mais severas de DP (TAKEICHI et al. 2000, UKAI et al. 2001, ROBERTS et al. 1997, EBERSOLE & TAUBMAN 1994, KAWAI et al. 2000, GORSKA et al. 2003, SIGUSCH et al. 1998, SALVI et al. 1998). Nesse sentido, demonstramos que pacientes com periodontite agressiva (de caráter mais severo e de progressão mais rápida) apresentam uma resposta predominante do tipo Th1, com intensa expressão de IFN- γ , correlacionada com uma intensa expressão de MMPs e RANKL (GARLET et al. 2003, GARLET et al., 2004). Em concordância com tais resultados, estudos demonstram que o IFN-y leva a um aumento de responsividade de fibroblastos gengivais a ação do LPS, levando a uma maior produção de citocinas inflamatórias (TAMAI et al. 2002, MOCHIZUKI et al. 2004). Além disso, o IFN-y está associado à diminuição na síntese de colágeno e ao aumento na síntese de MMPs por fibroblastos gengivais in vitro (MARTELLI-JUNIOR et al. 2003). De fato, a inoculação de Porphyromonas gingivalis em animais geneticamente deficientes de IFN-y resulta em uma menor reação inflamatória e reabsorção óssea (BAKER et al. 1999), sugerindo um importante papel de IFN-y na potencialização da severidade da DP. Ao contrário, certos estudos tem sugerido que altos níveis de IFN-y no tecido gengival estariam envolvidos na atenuação da severidade da doença (YAMAZAKI et al. 1995, GEMMELL et al. 1997, GEMMELL et al. 1998, BARTOVA et al. 2000, PETIT et al. 2001, KOBAYASHI et al. 2000). Tal hipótese encontra suporte em trabalhos que demonstram que IFN-y está associado à redução na diferenciação e ativação de osteoclastos, principalmente in vitro (MORIYAMA et al. 2002, TAKAYANAGI et al. 2002, UDAGAWA et al. 2003).

Além de atuar na determinação da severidade da doença, o IFN- γ está potencialmente envolvido no controle da infecção periodontal, uma vez que tal citocina estimula fibroblastos gengivais a produzirem NO (KENDALL *et al.* 2000, DAGHIGH *et al.* 2002), potencialmente envolvido no controle de microrganismos no microambiente periodontal (RAUSCH-FAN *et al.* 2001, KENDALL *et al.* 2001). Contudo, apesar das evidências sugestivas da participação de IL-12 e IFN- γ na patogênese das DPs, seu real papel na modulação da severidade da doença e no controle da infecção periodontal, assim como os mecanismos envolvidos em tais funções, permanecem desconhecidos.

Além de mediadores de respostas do tipo Th1, citocinas envolvidas em respostas Th2 têm sido identificadas em lesões periodontais e também estão potencialmente envolvidas na patogênese da doença (YAMAZAKI *et al.* 1995, GEMMELL *et al.* 1997, GEMMELL *et al.* 1998, BARTOVA *et al.* 2000, PETIT *et al.* 2001). A polarização de células Th2 é dependente da produção de citocinas como IL-4, e em alguns casos IL-13 (NELMS *et al.* 1999, MURPHY *et al.* 2002, ZHOU *et al.* 2003, JARNICKI *et al.* 2003, AGNELLO *et al.* 2003, STETSON *et al.* 2004, WYNN *et al.* 2004). Uma vez polarizadas, as células Th2 expressam preferencialmente receptores de quimiocinas como CCR4 e CCR8, (tornado-as responsivas a quimiocinas como CCL1 e CCL22) (ROSSI & ZLOTNIK 2001, HAMILTON *et al.* 2002, ROT *et al.* 2004), e se tornam competentes para produzir citocinas características do padrão Th2, como IL-4 e IL-10 (NELMS *et al.* 1999, PESTKA *et al.* 2004).

IL-4 é uma citocina pleiotrópica produzida principalmente por células Th2, que pode exercer efeitos estimulatórios ou supressivos em diferentes tipos celulares. As propriedades supressoras e anti-inflamatórias de IL-4 são em grande parte devidas a sua capacidade de inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias e IFN-γ, impedindo dessa forma a polarização de células Th1 (NELMS *et al.* 1999, AGNELLO *et al.* 2003, HAMILTON *et al.* 1999). Por outro lado, a IL-4 promove a maturação de células Th2 e age como fator de crescimento de células B, estimulando preferencialmente respostas imune do tipo humoral, e favorecendo o "switch" de classe para a produção de IgG1 e IgE (NELMS *et al.* 1999, AGNELLO *et al.* 2003). A IL-4 também pode agir amplificando respostas do tipo Th2 através da expressão de quimiocinas que levam ao recrutamento outras células Th2 (YAMASHITA *et al.* 2002, HAMILTON *et al.* 2002, ROT *et al.* 2004), ou estimulando a produção de outras citocinas que podem atuar de forma complementar ou sinérgica a IL-4 (JARNICKI *et al.* 2003, BRUBAKER *et al.* 2001, PESTKA *et al.* 2004). Uma dessas citocinas, a IL-10, também apresenta propriedades anti inflamatórias, reduzindo a expressão de moléculas co-

estimulatórias em células apresentadoras de antígenos e inibindo a síntese de citocinas inflamatórias e Th1 por células T, NK e macrófagos (HAMILTON *et al.* 1999, PESTKA *et al.* 2004, MOORE *et al.* 1993, ROUSSET *et al.* 1992, HSU *et al.*1992). Tal citocina está geralmente associada a uma significante redução na reação inflamatória, mas uma vez que interfere na resposta imune celular mediada por TNF- α e IFN- γ , a produção de IL-10 pode prejudicar eliminação de agentes infecciosos, levando a latência de infecções (BELKAID *et al.*2002, SAKAGUCHI 2004, MITTRUCKER *et al.* 2004).

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

Contudo, a presença e a função de IL-4 nos tecidos periodontais são controversas. Alguns estudos relatam a ausência, ou a rara e discreta detecção de IL-4 em lesões periodontais ou no fluido gengival de sítios com DP (FUJIHASHI *et al.* 1993, FUJIHASHI *et al.* 1996, KABASHIMA *et al.* 1996, YAMAZAKI *et al.* 1997, TOKORO *et al.* 1997, YAMAMOTO *et al.* 1997, SALVI *et al.* 1998). Entretanto, certos estudos demonstram uma intensa expressão de IL-4 e IL-13 em lesões periodontais e sugerem que a predominância de uma resposta do tipo Th2 contribua para a destruição tecidual no periodonto (LAPPIN *et al.* 2001, TOKORO *et al.* 1997, YAMAZAKI *et al.* 1996, YAMAZAKI K 1995). Tal hipótese é sustentada por achados histológicos que demonstram o acúmulo de células B em lesões periodontais crônicas, e que associam tal resposta à destruição dos tecidos periodontais (SEYMOUR *et al.* 1979, SEYMOUR *et al.* 1985, TOKORO *et al.* 1997, GEMMELL *et al.* 1998, BARTOVA *et al.* 2000). Ao contrário, estudos recentes demonstram que os níveis de IL-4 no fluido e no tecido gengival estão inversamente correlacionados com os níveis de citocinas pró-inflamatórias a com severidade da doença (UKAI *et al.* 2001, GORSKA *et al.* 2003, GIANNOPOULOU *et al.* 2003).

De forma similar, a expressão de IL-10 nos tecidos periodontais doentes também foi verificada em diversos estudos, tendo normalmente sido inversamente correlacionada à produção de citocinas pró-inflamatórias e a severidade da doença (YAMAZAKI *et al.* 1997, YAMAMOTO *et al.* 1997, LAPPIN *et al.* 2001, GEMMELL *et al.* 1998, FUJIHASHI *et al.*

1996, ARAMAKI et al. 1998). Nesse sentido, demonstramos que pacientes com periodontite crônica (menos grave e de progressão mais lenta) apresentam uma intensa expressão de IL-4 e IL-10, correlacionada a uma maior expressão de TIMPs e OPG, possivelmente envolvida na atenuação da severidade da doença (GARLET et al. 2003, GARLET et al. 2004). Dados provenientes de modelos experimentais de DP suportam tal hipótese, demonstrando que a ausência de IL-10 leva a uma maior reabsorção óssea alveolar (SASAKI et al. 2001, AL-RASHEED et al. 2003, SASAKI et al. 2004), e que células Th2 apresentam papel protetor com relação à severidade da doença (EASTCOTT et al. 1994). Entretanto, enquanto alguns estudos demonstram que os níveis de IL-10 parecem aumentar após o tratamento periodontal (CUTLER et al. 2000, GORSKA et al. 2003, GOUTOUDI et al. 2004), outros estudos demonstram uma maior concentração dessa citocina nos sítios apresentando doença ativa e uma diminuição em seus níveis após a terapia periodontal (GAMONAL et al. 2000). Dessa forma, assim como acontece com as demais citocinas anteriormente citadas, os reais papéis de IL-4 e IL-10 na determinação da severidade da DP e no controle da infecção periodontal, assim como os mecanismos moleculares envolvidos em sua função, permanecem pouco conhecidos.

Apesar das inúmeras controvérsias anteriormente citadas, estudos recentes têm demonstrado que mediadores de ambos os tipos de resposta Th estão presentes no tecido periodontal, e que o balanço dessa resposta poderia determinar o curso da doença: citocinas pró inflamatórias e Th1 estariam relacionadas a uma maior severidade da doença, enquanto mediadores anti-inflamatórios e Th2 atenuariam a severidade da doença (BAKER *et al.* 2001, TENG 2003, BERGLUNDH *et al.* 2001). Porém, o estabelecimento direto de uma relação de causa e efeito entre tais resultados e o estado clínico dos pacientes é um processo complexo, dificultado por possíveis diferenças com relação à composição da microbiota periodontal, época de estabelecimento, gravidade e progressão da doença, além da influência genética, de condições sistêmicas e ambientais.

Visando facilitar o estudo da imunopatogênese das DPs, modelos animais têm sido utilizados com sucesso, uma vez que tais variáveis podem ser controladas ou minimizadas, possibilitando a análise individual de fatores da resposta do hospedeiro, assim como o papel de diferentes periodontopatógenos (GENCO *et al.* 1998). Modelos utilizando camundongos apresentam vantagens como a ocorrência natural da doença em determinadas espécies, com prevalência e características comparáveis à doença humana (WIEBE *et al.* 2001), além da suscetibilidade à indução experimental de DP (BAKER *et al.* 1994, IWASAKI *et al.* 1998).

Além disso, camundongos apresentam custo relativamente baixo, são de fácil manejo e os processos inflamatórios e imunológicos são extensamente estudados e bem conhecidos. Seu "background" genético é conhecido e manipulável, permitindo que aspectos muito bem definidos possam ser avaliados de maneira precisa, através da geração de animais geneticamente modificados, ou da utilização de substâncias bloqueadoras ou antagonistas, que em sua grande maioria são desenvolvidas experimentalmente em camundongos (GENCO *et al.* 1998). O modelo experimental que temos empregado em nossos estudos foi baseado no originalmente desenvolvido por Baker e colaboradores (BAKER *et al.* 1994), diferindo basicamente na utilização do *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

O A. actinomycetemcomitans é considerado um dos principais periodontopatógenos, sendo relacionado como fator etiológico de determinados casos de periodontite agressiva, e presente em grande número dos casos de periodontite crônica. A virulência de tal microrganismo é relacionada à sua marcante capacidade de invasão tecidual, produção de diversas proteases e de uma potente leucotoxina, especialmente por determinados clones extremamente virulentos, como o JP2 (SPITZNAGEL *et al.* 1991, HAUBEK *et al.* 2004). Acredita-se que tais fatores de virulência interfiram na resposta imune contra tal patógeno, resultando em maior dificuldade na obtenção de sucesso no tratamento de pacientes com infectados com *A. actinomycetemcomitans*, assim como provavelmente potencializem os efeitos sistêmicos da infecção periodontal (SAITO *et al.* 1993, WILSON & HENDERSON 1995, FIVES-TAYLOR *et al.* 1995, FIVES-TAYLOR *et al.* 1995). Entretanto, o papel individual de periodontopatógenos como o *A. actinomycetemcomitans* nos efeitos locais e sistêmicos durante o curso da DP não são conhecidos, assim como pouco se sabe a respeito dos mecanismos imunes envolvidos no controle da infecção periodontal.

Em conjunto, características peculiares da DP como a anatomia da região periodontal e a diversidade de microrganimos no biofilme periodontal, constituem um verdadeiro desafio aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Ao mesmo tempo que a permanência de um foco infeccioso é potencialmente perigosa a saúde do hospedeiro, a manutenção de uma resposta imune e inflamatória crônica local leva a ocorrência de danos aos tecidos periodontais. Uma vez que as diversas citocinas presentes nas lesões periodontais podem regular tal processo, tanto no que diz respeito ao controle da infecção, como a determinação da severidade da DP, o objetivo deste estudo foi investigar a participação de citocinas na imunomodulação da doença periodontal experimental induzida por *A. actinomycetemcomitans*.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi investigar a participação de citocinas na imunomodulação da doença periodontal experimental induzida por *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

Mais especificamente, os objetivos deste estudo foram:

1- Analisar o papel do TNF- α na modulação da resposta inflamatória e na reabsorção óssea alveolar durante o curso da doença periodontal experimental, assim como seu papel no controle da infecção periodontal por *A. actinomycetemcomitans*.

2- Analisar o papel de IFN- γ e IL-12 na modulação da resposta inflamatória e na reabsorção óssea alveolar durante o curso da doença periodontal experimental, assim como seu papel no controle da infecção periodontal por *A. actinomycetemcomitans*.

3- Analisar o papel do IL-4 e IL-10 na modulação da resposta inflamatória e na reabsorção óssea alveolar durante o curso da doença periodontal experimental, assim como seu papel no controle da infecção periodontal por *A. actinomycetemcomitans*.

MATERIAIS E MÉTODOS

The providences from the State states of the states of the

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais de experimentação. Foram utilizados camundongos C57BL/6, camundongos geneticamente deficientes do receptor p55 do TNF-a (TNFp55KO), camundongos geneticamente deficientes do gene citocina IFN- γ (IFN- γ KO), camundongos geneticamente deficientes do gene que codifica a subunidade p40 da citocina IL-12 (IL-12KO), camundongos geneticamente deficientes do gene da citocina IL-4 (IL-4KO), camundongos geneticamente deficientes do gene da citocina IL-10 (IL-10), camundongos geneticamente deficientes do gene da enzima iNOS (iNOS-KO), todos do background C57BL/6, machos, com idade aproximada de 8 semanas, criados e mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia (FMRP-USP). As matrizes dos animais geneticamente modificados são provenientes do Jackson Laboratories (Bar Harbor, EUA). No decorrer do protocolo experimental os animais foram alimentados normalmente com ração e água, sendo que apenas nos dias das inoculações dos microrganismos a alimentação foi suprimida. Os grupos experimentais eram compostos por 12 a 20 camundongos, que foram monitorados durante o experimento diariamente com relação a possível mortalidade, e tiveram seu peso aferido durante o curso da infecção. O presente projeto foi submetido e aprovado pela comissão de ética em pesquisa animal (CETEA) da FMRP/USP (Anexo 01).

3.2. Protocolo de indução de doença periodontal. O modelo de doença periodontal experimentalmente induzida foi baseado no protocolo usado por Baker e colaboradores (BAKER *et al.* 1994). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* JP2 (ATCC 700685) foi cultivada em jarro de anaerobiose em meio agar suplementado (TSBV), como previamente descrito (ÁVILA-CAMPOS *et al.* 1995). Uma vez colhidos da placa, os microrganismos foram resuspendidos em 100 μl de PBS, e a concentração determinada comparando-se com

uma escala padrão de densidade bacteriana em meio líquido. As bactérias em suspensão eram diluídas de modo a atingir a concentração de 1x109 CFU em 100µl de PBS. O protocolo de indução de doença periodontal consistiu da inoculação oral de 10^9 CFU de A. actinomycetemcomitans em 100µl de PBS, acrescida de 2% de carboximetilcelulose, sendo esta suspensão aplicada diretamente na cavidade oral dos animais com o auxílio de um micropipetador automático. Após 48 horas e 96 horas, o procedimento de inoculação oral era repetido. A adição de carboximetilcelulose à suspensão de bactérias possibilita a retenção temporária dos microrganimos e a colonização da cavidade oral pelo A. actinomycetemcomitans; eliminando a necessidade da injeção direta das bactérias dentro do tecido periodontal ou uso de ligaduras, que podem resultar em trauma mecânico ao tecido. Para a contagem de tempo de infecção, a primeira administração dos microrganismos foi considerada como tempo 0h. Grupos de camundongos C57BL/6 (WT), TNFp55-KO, IFNγKO, IL-12KO, IL-4KO, IL-10KO e iNOS-KO receberam a inoculação de A. actinomycetemcomitans simultaneamente, sendo denominados de "infectados". Grupos adicionais de camundongos C57BL/6 (WT) e IFN-γKO receberam a adminstração oral de Porphyromonas gingivalis (ATCC 49417; cultivada como previamente descrito por BAKER et al. 1994), em protocolo similar ao descrito para a inoculação de A. actinomycetemcomitans. Grupos controle consistiam de animais "sham-infectados" (os quais recebiam a administração oral de 100µl de uma solução 2% de carboximetilcelulose em PBS, com metodologia semelhante à descrita para o grupo anterior) e de um grupo de animais não infectados.

3.3. Coleta de amostras. Diferentes amostras foram coletadas para distintos métodos de investigação. Para a extração de RNA e posterior análise de expressão gênica, foram coletadas amostras compostas pelo tecido gengival palatino e vestibular, molares superiores e tecido periodontal subjacente (ligamento e tecido ósseo alveolar e palatino). Para sua remoção, eram

realizadas duas incisões na região palatina, uma mesial e outra distal aos molares, ambas perpendiculares a linha média, sendo em seguida seccionado o arco zigomático, assim como as bases dos processos alveolares direito e esquerdo. As amostras eram então fragmentadas com auxílio de um cinzel, transferidas para um tubo "eppendorf" contendo Trizol (Invitrogen Life Technologies, EUA), e armazenadas a -70°C (para as análises de expressão gênica). As amostras coletadas para a análise histopatológica também eram compostas pelo tecido gengival palatino e vestibular, molares superiores e tecido periodontal subjacente (ligamento e tecido ósseo alveolar e palatino), embebidas solução de formol a 10% e armazenadas a temperatura ambiente.

As amostras de tecido gengival palatino foram utilizadas para a análise quantitativa e qualitativa das células inflamatórias, análise da carga bacteriana no tecido periodontal, análise dos níveis de MPO, e para a quantificação de citocinas por ELISA. Para sua remoção, foi realizada uma incisão no palato, distal aos molares, perpendicular a linha média. A partir da incisão o tecido palatino foi descolado em toda a sua extensão com um descolador de Molt, até a mesial dos molares, sendo então realizada uma nova incisão de modo a remover o tecido. Para a análise do infiltrado inflamatório as biópsias eram colocadas temporariamente em uma solução salina e imediatamente processadas. Para análise da carga bacteriana nos tecidos periodontais as amostras eram armazenadas em água mili-Q e armazenadas a -70°C. Para análise dos níveis de MPO as amostras eram e congeladas em nitrogênio líquido e conservadas a temperatura de -70°C. Para os ensaios de ELISA, as amostras eram homogenizadas em solução de PBS 1X contendo inibidor enzimático (Protease Inhibitor - Boehringer Mannhein, Alemanha), e armazenadas a -70°C até a realização dos ensaios de ELISA.

Para a análise do nível ósseo alveolar, após a remoção do tecido gengival palatino descrita anteriormente, foram realizadas duas incisões na região palatina, uma mesial e outra

distal aos molares, ambas perpendiculares a linha media, sendo em seguida seccionado o arco zigomático, assim como as bases dos processos alveolares direito e esquerdo. A peça cirúrgica, contendo os processos alveolares direito e esquerdo, os dentes e o palato ósseo era lavada em PBS 1X, e então armazenada a -20 C.

Além da coleta de amostras de tecido periodontal, fragmentos de estômago, intestino, coração, pulmão, fígado, cérebro, rim e baço foram coletados para análise histológica (armazenados em formol, como previamente descrito) e quantificação da carga bacteriana (armazenados em água mili-Q e armazenados a -70°C, como previamente descrito). Fragmentos de fígado também foram para análise da expressão de proteína C reativa, sendo armazenados em Trizol (Invitrogen Life Technologies). Determinados com base em estudos anteriores, o sacrifício dos animais e coleta de amostras foram realizadas nos tempos de 0h, 1, 7, 15, 30 e 60 dias após a inoculação inicial de *A. actinomycetemcomitans*.

3.4. Avaliação da reabsorção óssea alveolar. Para a avaliação do nível ósseo alveolar a peça cirúrgica, contendo os processos alveolares, dentes e palato ósseo, foi separada em duas hemiarcadas pela ruptura da sutura palatina. As peças cirúrgicas foram então tratadas com solução de peróxido de hidrogênio 15% em água, por 24 horas, para a remoção dos tecidos moles, lavadas em seguida com PBS 1X e deixadas para secar a temperatura ambiente. O material foi então fotografado em lupa de dissecção (Leica Microsystems, Heerbrugg, Suiça), com aumento de 20 vezes, com a face oclusal dos molares posicionada perpendicularmente a base da lupa, de modo a ser fotografada a face palatina. As imagens foram digitalizadas via scanner (Color Page Vivid Pro II – Genius, Brasil), com resolução de 300 dpi, recebendo então um código aleatório, de modo a que quando fosse realizada a medição o examinador não soubesse a que grupo ou tempo a amostra fazia parte. Com o auxílio do programa de análise de imagens ImageTool 2.0 (The University of Texas Health Science Center, EUA), foi realizada

então a medição da área compreendida entre a junção amelo-cementária (JAC) e a crista óssea alveolar (COA), em unidades arbitrárias de área (UAA), correspondentes aos pixels contidos na área selecionada. As medições foram realizadas por um único examinador calibrado, em duplicata, com intervalo de 1 semana entre as medições. Para cada animal, a perda óssea alveolar foi definida como a média do aumento na área entre a JAC e a COA (avaliada na face palatina dos 6 dentes posteriores), com relação aos valores de da área JAC-COA provenientes dos animais WT não infectados, em cada tempo analisado. Para as análises da reabsorção óssea alveolar, foram analisadas maxilas proveniente de 3 camundongos de cada grupo experimental, coletadas nos tempos de 0h, 7, 15, 30 e 60 dias após a infecção. Os resultados apresentados representam os valores da média ± SD de três experimentos independentes.

3.5. Análise histopatológica. Para a análise histopatológica, aos tempos de 0, 15, 30, e 60 após a infecção dois animais foram selecionados aleatóriamente de cada grupo experimental e sacrificados. A peça contendo tecido peridontal, ósseo e os molares superiores foi então fixada em solução de paraformaldeído 4%, pH 7.4, em temperatura ambiente, pelo tempo mínimo de 48h. Após a fixação, as peças foram descalcificadas em solução a 10% de ácido tricloroacético, em temperatura ambiente, pelo tempo de 5 horas. Em seguida, as peças foram colocadas em solução de sulfato de sódio a 5%, para neutralização da reação. O passo seguinte foi a desidratação gradativa em álcool, seguida de xilol e processamento em parafina. Cortes seriados com espessura de 5µm foram obtidas através de um micrótomo, montados em lâminas pré-tratadas com poli-L-lisina a 0,1% (Sigma, St. Louis, EUA), e corados com coloração em hematoxilina e eosina. A análise histopatológica foi realizada através da análise de cortes seriados em microscopia ótica, visando basicamente a análise da presença e da localização de células inflamatórias nos tecidos periodontais, assim como as características

histológicas do epitélio juncional. Para a análise histopatológica, aos tempos de 0, 15, 30, e 60 após a infecção foram selecionados aleatóriamente dois animais de cada grupo experimental.

3.6. Análise quantitativa e qualitativa do infiltrado inflamatório. A análise quantitativa e fenotípica de células extraídas dos tecidos periodontais foi realizada por contagem em câmara de Neubauer e citometria de fluxo. Para tanto, as amostras de tecido periodontal palatino foram coletadas (como previamente descrito) e depositados, com o tecido conjuntivo em contato com fundo de poço, em placas de 12 orifícios (Corning Incorporated, Corning, EUA) e então incubadas a 37°C durante 1 hora em 1 ml de meio incompleto (RPMI) e liberase (Liberase Blendzyme CI - Roche Ltd, Suíça)(1:100). As amostram foram então colocadas em câmaras para trituração (Medcons - BD Biosciences EUA) juntamente com meio contendo soro bovino fetal a 10% e DNAse 0,05% (Sigma DN-25; Sigma Co, EUA) e processsados no aparelho triturador (MedMachine; BD Biosciences) por 4 min. O líquido foi aspirado com uma seringa de 10ml, filtrado (Filcons; BD Biosciences) em tubo Falcon de 15ml e adicionados aproximadamente 10ml de meio completo e DNAse. A suspensão celular foi centrifugada a 500g por 10 minutos. O sedimento obtido foi ressuspenso em 1ml de meio completo a 10%. Após o processamento, a viabilidade celular foi verificada através de coloração com azul de tripam, e as células viáveis foram então contadas em câmara de Neubauer. O número absoluto de células viáveis foi então utilizado para a análise quantitativa das células inflamatórias. Para as análises de citometria de fluxo, 1x10⁶ células foram filtradas em filtro de 50-µm, incubadas com anticorpos bloqueadores da porção Fc de imunoglobulinas (anti-CD16/CD32- clone 2.4G2- BD Biosciences Pharmingen) por 45 minutos a 4°C e, em seguida, com os anticorpos contra determinantes específicos por 30 minutos a 4°C. Para a fenotipagem celular foram utilizados anticorpos conjugados a PE ou FITC específicos para os seguintes marcadores: CD3, CD4, CD8, GR1 e F4/80, assim como seus respectivos isotipos
controle (BD Biosciences). As células foram centrifugadas, ressuspensas em PBS-formol e a leitura realizada em FACScan (FACScan[™] and CELLQuest[™] software; BD Biosciences). As células foram adquiridas em FACsorting (BD Biosciences), utilizando os canais de fluorescência 1 (FL1) para FITC e canal 2 (FL2) para PE. As análises foram feitas usando programas Cell Quest (CELLQuest software; BD Biosciences) e WinMDI (WinMDIv2.8; – The Scripps Research Institute, EUA) os quais permitem analisar todas as células adquiridas (10000/amostra) ou apenas determinadas populações, individualizadas por janelas estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL). O número absoluto das células GR1+, CD3+CD4+ , CD3+CD8+, F4/80+, CD19+, foi calculado proporcionalmente em relação ao número de células totais. Para as análises quantitativa e qualitativa das células inflamatórias nos tecidos peridontais, foi utilizado um "pool" contendo o tecido gengival palatino de 3 animais de cada grupo experimental, coletados nos tempos de 0h, 7, 15, 30 e 60 dias após a infecção. Os resultados apresentados representam os valores da média ± SD, do número de células por animal, provenientes de três experimentos independentes.

3.7. Extração de RNA e transcrição reversa. A extração do RNA total foi realizada com o reagente Trizol, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante (Invitrogen Life Technologies, EUA). Brevemente, após a coleta de cada amostra, estas eram fragamentadas com auxílio de um cinzel (autoclavado e tratado com água DEPC), e transferidas para um tubo tipo "eppendorf", ao qual foi adicionado o reagente Trizol (na proproção de 1ml de Trizol para cada 1mg de tecido), sendo agitado por 30 segundos e deixado a temperatura ambiente por 5 minutos. Para cada 1 ml da suspensão foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio (Sigma), sendo as amostras e centrifugadas a 12000g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, ao qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol,

sofrendo agitação em "vortex" e incubado por 20 minutos a -20°C para precipitar o RNA da fase aquosa. Novamente os tubos foram centrifugados a 12000g por 15 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado em etanol 100%, sendo então seco a temperatura ambiente, com o tubo invertido sobre um papel de filtro. As amostras de RNA foram suspensas em 50µl de água deionizada e livre de RNAse, sendo então as amostras armazenadas a –70°C. Uma alíquota de 5µl foi utilizada para determinar a concentração de RNA/µl nas amostras, usando o aparelho GeneQuant (Pharmacia Amersham Biosciences, EUA). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado através de uma reação de transcrição reversa, com a utilização de uma transcriptase reversa (Superscript II – Invitrogen Life Technologies) utilizando 5µg de RNA; e tendo como volume final de reação 200µl.

3.8. Reações de RealTimePCR. A expressão quantitativa de genes de citocinas e quimiocinas, assim como a quantificação da carga bacteriana no tecido periodontal, foi analisada através de reações de RealTimePCR, utilizando-se o sistema SYBRGreen em um aparelho ABI5700 (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). Primers adequados para tais reações foram criados a partir de seqüências de mRNA para os genes alvos, do programa Primer Express (Applied Biosystems), e se encontram descritos, assim como as propriedades de cada reação (concentração de primer utilizada, temperatura de annealing, temperatura de melting, tamanho do fragmento de amplificação) no Anexo 02. Para as reações de RealTimePCR, foram utilizados 12,5µl do reagente SYBRGreen Master Mix (Applied Biosystems; que contém o fluoróforo SYBRGreen 1; a enzima polimerase AmpliTaq Gold; DNTPs com dUTP; o fluoróforo ROX, utilizado como referência passiva para normalização dos níveis de fluorescência; e os demais componentes de tampão, já devidamente otimizados), 5µl da solução de cDNA (sintetizado como previamente descrito), 4µl de água MiliQ tratada com DEPC, e 1µl da solução contendo cada primer (a partir de uma solução stock, na qual

cada primer se encontra na concentração de 1 µg/µl, eram preparadas alíquotas de modo a ajustar a concentração ideal de primer a ser utilizada em cada reação para o volume de 1µl; as concentrações exatas de cada primer utilizado estão descritas no Anexo 02). A reação de amplificação compreende basicamente 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, além de um ciclo final de vinte minutos, com temperatura crescente de 60 a 95°C, empregada para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Variações na temperatura de annealing para cada primer utilizado estão descritas no Anexo 02. Previamente, as reações de RealTimePCR foram otimizadas com relação as concentrações ideais de cada par de primers e temperatura de annealing, de modo a maximizar eficiência e a especificidade de amplificação (exemplificado no Anexo 03). Durante a padronização, os produtos de amplificação também foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, corados com nitrato de prata 0.2% diluído em água bidestilada, e analisados quanto a sua especificidade através da análise no gel (análise do tamanho do fragmento de amplificação em comparação a padrões de peso molecular, e análise da presença ou ausência de bandas inespecíficas). O sistema utilizado realiza as reações de amplificação e detecção, e quantifica as amostras (o termociclador ABI5700 associado ao Software ABI Prism, Applied Biosystems) através da análise do nível de fluorescência gerado pela incorporação nucleases fluorogênicas (SYBRGreen 1) aos produtos de amplificação durante o curso da reação. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cicle threshold – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos aonde a amplificação das amostras, atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado; exemplificado no Anexo 04. Todas as amostras também foram submetidas a reações para a detecção de RNA mensageiro para a beta-actina, um gene de expressão

constitutiva, utilizado como controle positivo da reação de amplificação; assim como os níveis de expressão de beta-actina foram utilizados para a normalização dos níveis de expressão do gene alvo. Uma amostra negativa (água) foi submetida a reação com cada par das seqüências dos primers utilizados. Para as reações de RealTimePCR, foram utilizadas independentemente amostras de cDNA proveniente do RNA extraído do tecido periodontal de 2 animais de cada grupo experimental, coletados nos tempos de 0h, 7, 15, 30 e 60 dias após a infecção. Os resultados apresentados representam os valores da média \pm SD, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 2 animais de cada grupo experimental. Um experimento representativo de três experimentos independentes.

3.9. Detecção e quantificação de A. *actinomycetemcomitans e P. gingivalis*. Para a detecção da presença de *A. actinomycetemcomitans* nos diferentes órgãos analisados (tecido gengival palatino, estômago, intestino grosso, fígado, rins, coração, pulmão, cérebro), foram utilizadas reações de PCR. A extração de DNA bacteriano foi realizada conforme método previamente descrito (ÁVILA-CAMPOS *et al.* 2002), com pequenas modificações. Para tanto, após a coleta dos órgãos em água mili-Q estéril, como previamente descrito, os mesmos foram homogenizados através da utilização de um triturador de tecidos (UltraTurrax 8.0; IKA, Staufen, Alemanha). As amostras foram então centrifugadas a 13000g por 10 minutos, sendo o sedimento resuspendido em 500 µl de água mili-Q estéril. As amostras foram então fervidas por 10 minutos, e novamente centrifugadas. Após a centrifugação, as amostras foram ressuspendidas em 10µl de água mili-Q estéril. Para a detecção do DNA de *A. actinomycetemcomitans*, 3µl da amostra foram utilizados para a realização de reações em cadeia da polimerase (PCRs) foram realizadas utilizando a enzima Taq polimerase (Gibco – Life Technologies) no

termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, EUA). Primers adequados para tal reação foram utilizados conforme previamente descrito (ÁVILA-CAMPOS et al., 2002), e se encontram descritos, assim como as propriedades de reação; no Anexo 01. As condições básicas da reação de PCR para detecção de A. actinomycetemcomitans foram: 30 ciclos de 1 minuto a 94°C para desnaturação, 1 minuto a 54°C anelamento dos primers às fitas do cDNA e 2 minutos 72°C de extensão, acrescidos de um passo de extensão final de 7 minutos a 72°C, com os primers específicos descritos no apêndice. Como controle positivo da reação de amplificação, foi utilizada uma amostra de DNA proveniente de cultura de AA. Uma amostra negativa (água) foi submetida a reação com cada par das seqüências dos primers utilizados. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e corados com nitrato de prata 0.2% diluído em água bidestilada. Após secos em temperatura ambiente, os géis foram digitalizados com a utilização de um scanner. Para a quantificação da carga bacteriana nos tecidos periodontais, o DNA genomico bacteriano foi extraído como previamente descrito, e submetido a reações de RealTimePCR, como previamente descrito (SAKAMOTO et al. 2001), utilizando-se o sistema SYBRGreen em um aparelho GeneAmp 7000 (Applied Biosystems). O DNA bacteriano foi utilizado juntamente com o reagente SYBRGreen Master Mix (Applied Biosystems). Para a quantificação de Α. actinomycetemcomitans e P. gingivalis, empregamos reações de reações de RealTimePCR, nas quais foram utilizados 12,5µl do reagente SYBRGreen Master Mix (Applied Biosystems), 5µl da solução de DNA bacteriano, 4µl de água MiliQ tratada com DEPC, e 1µl da solução contendo cada primer (as concentrações exatas de cada primer utilizado estão descritas no Anexo 02). A reação compreende basicamente 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, além de um ciclo final de vinte minutos, com temperatura crescente de 60 a 95°C, empregada para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cicle threshold – ou ciclo limiar), como previamente descrito. Para a normalização dos valores de expressão de DNA de *A. actinomycetemcomitans*, foram utilizados os valores do peso do fragmento de tecido periodontal utilizado para a extração. Assim como descrito para as análises de expressão gênica, as reações de PCR e RealTimePCR para detecção e quantificação de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* foram otimizadas com relação as concentrações ideais de cada par de primers e temperatura de annealing, de modo a maximizar eficiência e a especificade de amplificação. Para as reações de detecção e quantificação de *A. actinomycetemcomitans* ou *P. gingivalis*, foram utilizadas independentemente amostras de DNA proveniente do tecido gengival palatino de 2 animais de cada grupo experimental, coletados nos tempos de 0h, 7, 15, 30 e 60 dias após a infecção. Os resultados representam os valores da média \pm SD, da intensidade de detecção do DNA alvo, obtidos de 2 animais de cada grupo experimental. Um experimento representativo de três experimentos independenters.

3.10. Dosagem de citocinas por ELISA. A produção de citocinas nos tecidos periodontais também foi analisada por ELISA, como previamente descrito (TALVANI A *et al.* 2003). Para tanto, o tecido gengival palatino foi coletado (conforme previamente descrito), pesado, e homogenizado com o homogenizador de tecidos (Ultra Turrax – IKA, Alemanha) em solução de PBS 1X contendo inibidor enzimático (Protease Inhibitor - Boehringer Mannhein, Alemanha). O homogenizado foi centrifugado a 2500g por 10 minutos a 4°C, sendo então o sobrenadante coletado e armazenado a -70°C até a realização dos ensaios de ELISA. As citocinas IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10, foram quantificadas utilizando kits Quantikine (R&D Systems, EUA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. A concentração das diferentes citocinas e quimiocinas nos sobrenadantes de tecido periodontal foi determinada a partir dos valores obtidos com as respectivas curvas-padrão. Os níveis de

sensibilidade dos kits utilizados eram de: IL-1 β >3 pg/ml, TNF- α >3,4 pg/ml, IFN- γ >2 pg/ml, IL-4 >2 pg/ml e IL-10 >4 pg/ml. Para os ensaios de ELISA foi utilizado um pool de tecido gengival palatino, proveniente de 5 camundongos por grupo, sacrificados nos tempos de 0h, 7 e 30 dias após a infecção. Os resultados apresentados são expressos como valores da média ± SD de picogramas de citocina por miligrama de tecido, e representam os valores de duplicatas de cada amostra, obtidos em dois experimentos independentes.

3.11. Análise qualitativa e semi-quantitativa dos níveis de proteína C reativa (CRP). A análise qualitativa e semi-quantitativa da presenca CRP no soro dos animais infectados com A. actinomycetemcomitans foi realizada através de kit comercial, utilizado para diagnóstico laboratorial, baseado nas recomendações do fabricante (Labtest Diagnóstica, Brasil), com algumas modificações. Amostras de soro em volume de 50 ul, nas diluições de 4, 16, 64, 128 e 256 vezes, foram depositadas em orifícios de uma placa de 96 poços, assim como 50µl dos controles positivo e negativo. A cada orifício foi adicionado 50 ul de NaCl a 0,9% e 50µl da solução contendo as partículas de látex sensibilizadas com anticorpos anti-CRP. A placa foi então submetida a agitação em movimentos circulares em um agitador por 2 minutos, sendo então analisada a presença ou não de aglutinação macroscópica, comparando o resultado da amostra com os padrões e controles. Foi considerado como título da amostra a maior diluição que apresentou aglutinação macroscópica. Para a análise semi-quantitativa, foi realizado um cálculo no qual o nível de sensibilidade do teste (6,0 mg/L), foi multiplicado pelo no título de cada amostra, sendo o resultado expresso em mg/ml. Para as análises qualitativa e semiquantitativa dos níveis de proteína C reativa no soro dos animais durante o curso da DP experimental, foram utilizadas independentemente amostras de soro provenientes 3 animais de cada grupo experimental, coletadas nos tempos de 0h, 15, 30 e 60 dias após a infecção. Os

resultados representam os valores da média \pm SD, dos níveis de CRP em μ g/ml, de 3 experimentos independentes.

3.12. Dosagem de mieloperoxidase (MPO). A análise da atividade de MPO nos tecidos periodontais foi realizada como previamente descrito (SOUZA *et al.* 2004). Para tanto, o tecido periodontal palatino foi homogeneizado em tampão contendo NaCl (1,0M), NaPO4 (0,02M), NaEDTA (0,015M), gelado e em pH 4.7. O homogenato foi centrifugado a 3000g por 15 minutos, sendo então submetido a choque hipotônico com 900µl de NaCl 0,2%, seguido por 900 ul de NaCl 1,6% e glicose 5%. Depois de novamente centrifugado, o pellet foi ressuspenso em tampão NaPO4 (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de tetrametilbenzidine (1,mM) e H2O2 (0,5 mM). Em seguida, o homogenato foi submetido a congelamento e descongelamento por 3 vezes, e centrifugado por 10000g por 15 minutos a 4°C. A determinação da atividade de MPO foi realizada por meio da análise da densidade óptica (DO) a 450nm, utilizando-se tetrametilbenzidine (1,6mM) e H2O2 (0,5mM). Para a dosagem de MPO, foi utilizado um pool de tecido gengival palatino, proveniente de 5 camundongos por grupo, sacrificados nos tempos de 0h, 7 e 30 dias após a infecção. Os resultados representam os valores de duplicatas de cada amostra, obtidos em dois experimentos independentes.

3.13. Dosagem de anticorpos. Os títulos de anticorpos específicos para o periodontopatógeno *Actinobacillus actinomycetemcomitans* foram aferifos no soro de animais durante o curso da DP experimental, como previamente descrito (VILKUNA-RAUTIAINEN *et al.* 2002). O sangue de animais infectados ou não foi coletado via punção venosa, nos tempos de 0h, 15, 30 e 60 dias após a infecção. O soro obtido através da centrifugação do sangue total a 1000g por 5 min foi aliquotado (100 μL), congelado e armazenado a uma temperatura de -20°C. Placas para ELISA de baixa afinidade (Corning) foram recobertas (50µL/poço) com tampão carbonato-bicarbonato 0,06M, pH 9.5, contendo os antígenos de A. actinomycetemcomitans numa concentração final de 5µg/mL, sendo então a placa por 24 horas a 4°C em câmara úmida. As placas foram lavadas 3 vezes com solução tamponada de fosfato (PBS), pH 7.2, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) em lavador automático de placas (ImmunoWash 1575, Bio-Rad Laboratories, EUA) e incubadas com solução de PBS acrescido de 5% de leite em pó desnatado (PBS-M), durante 1 a 2 horas, a temperatura ambiente. Após esse período de incubação, a placa foi novamente lavada com PBS-T. Aos poços da placa foram adicionadas, em duplicata, as amostras de soro em diluição seriada em PBS-M, e incubadas por 2 horas a 37°C em câmara úmida. A placa foi novamente lavada com PBS-T, então foram adicionados os anticorpos anti imunoglobulina de camundongo. Foram utilizados anticorpos anti-IgG marcado com peroxidase (Pierce, EUA) e, para dosagem de IgG1 e IgG2a foram utilizados anticorpos anti-IgG1 ou anti-IgG2a não marcados feito em coelho (ZIMED, EUA), os quais foram então detectados utilizando-se anticorpo anti-coelho feito em cabra conjugado com peroxidase (ZIMED, EUA). Novamente as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C em câmara úmida e lavadas com PBS-T. Foi então adicionado às placas o substrato da peroxidase, o orto-fenilenodiamino-2HCl (OPD) (Abbot Laboratories, EUA). A reação colorimétrica foi bloqueada após 10 minutos com ácido sulfúrico (Merck) 1N e a leitura realizada a 490nm em leitor de microplacas (EMAX - Molecular Devices Corporation, EUA). A densidade óptica obtida no soro de camundongos não infectados foi utilizado como linha de corte para a detecção para cada isotipo. A densidade óptica de cada diluição do soro dos animais infectados foi comparada com a densidade óptica dos animais controles e o título para cada amostra foi expresso segundo a maior diluição conseguida. Para as análises de anticorpos específicos para A. actinomycetemcomitans, foram utilizadas independentemente amostras de soro provenientes 3 animais de cada grupo experimental, coletadas nos tempos de 0h, 15, 30 e 60 dias após a infecção. Os resultados representam os valores da média \pm SD, dos títulos de anticorpos específicos para *A. actinomycetemcomitans*, de 3 experimentos independentes.

3.14. Análise estatística. Análises entre três ou mais grupos experimentais, como os dados relativos ao número de células inflamatórias, nívies de reabsorção óssea, níveis de expressão de mRNA, dos grupos de animais C57BL/6(WT) e das diferentes linhagens de camundongos KOs, infectados ou grupos controle, foram submetidos ao teste estatístico one-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. Análises entre apenas dois grupos ou amostras, foram realizadas através do teste "t". Possíveis correlações serão analisadas através de regressão linear e do teste de Pearson. Para todas as análises, valores de P<0.05 foram considerados estatisticamente significantes. Todos os testes estatísticos foram aplicados através do programa GraphPad Prisma 3.0 (GraphPad Software Inc, EUA).

RESULTADOS

The providence of the second of the second

4. RESULTADOS

4.1. Quantificação da reação inflamatória e perda óssea alveolar induzida por A. *actinomycetemcomitans*

Nosso primeiro passo foi a análise da cinética de desenvolvimento da resposta inflamatória em resposta a inoculação oral de *A. actinomycetemcomitans* em camundongos C57BL/6. Para tanto, os animais submetidos à inoculação das bactérias foram analisados quanto ao desenvolvimento de reação inflamatória nos tecidos periodontais e perda óssea alveolar, em diferentes tempos pós-infecção (Fig. 1). Nossos resultados demonstram que os animais infectados apresentaram um significativo aumento do número de leucócitos extraídos do tecido periodontal aos 7 (P<0.001), 15 (P<0.001), 30 (P<0.001) e 60 (P<0.001) dias após a inoculação cimical dos microrganismos, quando comparados aos animais controle e shaminfectados (Fig. 1A). Além disso, verificamos que camundongos submetidos ao protocolo de infecção com *A. actinomycetemcomitans* apresentam significativa reabsorção óssea alveolar, determinada pelo crescente aumento na área compreendida entre a junção amelo-cementária (JAC) e a crista óssea alveloar (COA) nos tempos de 15 (P<0.01), 30 (P<0.001), 45 (P<0.001) e 60 (P<0.001) dias pós infecção (Fig. 1B), quando comparados aos grupos controle. Ao contrário, os animais não infectados e sham-infectados não apresentaram perda óssea no período estudado (Fig. 1B).

4.2. Análise histopatológica dos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A*. *actinomycetemcomitans*

No tempo de 0h, visualizamos apenas algumas células inflamatórias próximas ao epitélio juncional, o qual se apresenta histologicamente sem alterações perceptíveis (Fig. 2A).



Figura 01 - Quantificação da reação inflamatória e perda óssea alveolar induzida por A. actinomycetemcomitans. Camundongos C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans*, grupos controle de animais não infectados e sham-infectados, foram analisados quanto a cinética de desenvolvimento de reação inflamatória nos tecidos periodontais e perda óssea alveolar. A) Número de leucócitos extraídos através de digestão enzimática do tecido periodontal, corados com azul de tripam e contados em câmara de Neubauer. B) Aumento na distância entre a junção amelo-cementária (JAC) e a crista óssea alveolar (COA) na face palatina dos molares, medida em unidades arbitrárias de área (UAA) com o programa ImageTool 2.0, em relação aos animais controle. Os resultados apresentados representam os valores da média ± SD, da área JAC-COA (obtidos de 3 animais) ou número de células por animal (obtidos de 5 animais) em cada tempo, representativos de três experimentos independentes. A) *P<0.001 vs C; B) *P<0.01 vs WT



Figura 02 - Análise histopatológica dos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans.* Camundongos C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans* foram sacrificados após 0h (A), 15 (B), 30 (C) e 60 (D) dias de infecção. Amostras de tecido periodontal coletadas, fixadas em paraformaldeído, desmineralizadas com ácido tricloroacético, inclusos em blocos de parafina. Cortes de 5 μm de espessura foram obtidos com auxílio de um micrótomo, corados com hematoxilina e eosina, e submetidos a análise histopatológica. Aumento original 40X. Resultados obtidos de dois animais de cada grupo experimental, representativos de 3 experimentos independentes. Contudo, aos 15 dias pós infecção, nota-se a presença de um significativo infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo, principalmente na região adjacente ao epitélio juncional e nas proximidades da crista óssea alveolar, além da proliferação de células do epitélio juncional (Fig. 2B). Nos tecidos periodontais coletados 30 dias após a infecção, verifica-se um infiltrado inflamatório mais intenso nas proximidades do epitélio juncional, principalmente nas adjacências da crista óssea alveolar (Fig. 2C). Resultados similares foram observados em cortes histológicos de tecido periodontal aos 60 dias após a infecção (Fig. 2D).

4.3. Análise fenotípica dos leucócitos extraídos dos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*

Após a análise histopatológica e da quantificação dos leucócitos nas lesões, nosso próximo passo foi a análise fenotípica das células inflamatórias presentes nos tecidos periodontais. Para tanto, animais submetidos ao protocolo de indução de DP foram sacrificados, amostras de tecido periodontal palatino coletadas, submetidas à digestão enzimática e os leucócitos foram analisados fenotipicamente (Fig. 3). Nossos resultados demonstram que neutrófilos (células GR1+, definidas como >90% de neutrófilos através da análise de complexidade e tamanho celular) foram encontrados nos tecidos 1 dia após a infecção (p<0.001 vs 0h), alcançando um número máximo 7 dias mais tarde (p<0.001 vs 0h). Os neutrófilos também foram encontrados nos tecidos periodontais em números significativos aos 15 (p<0.001 vs 0h), 30 (p<0.001 vs 0h) e 60 dias (p<0.001 vs 0h) pós-infecção. Os nossos resultados também mostram um aumento significativo no número de macrófagos (células F4/80+) nos tempos de 1 (p<0.001 vs 0h), 7 (p<0.001 vs 0h), 15 (p<0.001 vs 0h), 30 (p<0.001 vs 0h) dias após a infecção, quando comparados ao tempo inicial (Fig. 3). Ao analisarmos o número de linfócitos T CD4 (células CD3+CD4+)



Figura 03 - Análise fenotípica dos leucócitos extraídos dos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal palatino de camundongos C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans* foram coletadas, submetidas à digestão enzimática, e a contagem de células realizada em câmara de neubauer. Para as análises de citometria de fluxo, 1x10⁶ cel/ml células foram incubadas com anticorpos conjugados a PE ou FITC, específicos para os seguintes marcadores: CD3, CD4, CD8, GR1 e F4/80, e a análise realizada em FACScan utilizando-se parâmetros de tamanho (FSC), granularidade (SSC), e fluorescência (FL1 e FL2). O número absoluto das células GR1+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, F4/80+, CD19+, foi calculado proporcionalmente em relação ao número de células totais. Os resultados representam os valores da média ± SD, do número de células por animal, provenientes de dois experimentos independentes. *p<0.001 vs 0h.

verificamos que nos tempos de 0 e 1 dia após a inoculação dos microrganismos, tais células se encontravam em pequeno número nos tecidos periodontais. Aumentos significativos destas foram constatados aos 7 (p<0.001 vs 0h), 15 (p<0.001 vs 0h), 30 (p<0.001 vs 0h) e 60 (p<0.001 vs 0h) dias após a infecção (Fig. 3). De forma similar, constatamos a presença de linfócitos T CD8 (células CD3+CD8+) em pequeno número nos tecidos periodontais nos tempos de 0 e 1 dia após a infecção; e aumentos significativos foram constatados nos tempos de 7 (p<0.001 vs 0h), 15 (p<0.001 vs 0h), 30 (p<0.001 vs 0h) e 60 (p<0.001 vs 0h) dias após a infecção; e aumentos significativos foram constatados nos tempos de 7 (p<0.001 vs 0h), 15 (p<0.001 vs 0h), 30 (p<0.001 vs 0h) e 60 (p<0.001 vs 0h) dias após a infecção ao número de linfócitos B (células CD19+) nos tecidos periodontais, nossos resultados demonstram que tais células estavam presentes em pequeno número nos tempos de 0, 1 e 7 dias pós infecção. Um aumento significativo no número de tais células foi verificado nos tempos de 30 (p<0.001 vs 0h) e 60 (p<0.001 vs 0h) dias pós infecção (Fig. 3).

4.4. Cinética de expressão de citocinas tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*

Uma vez que diversas citocinas tem sido implicadas na patogênese das DPs, nosso próximo passo foi caracterizar a cinética e o padrão de expressão de tais fatores durante o curso da doença experimental. Para tanto, camundongos C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans* foram sacrificados em diferentes tempos após a infecção, amostras de tecido periodontal foram coletadas, o RNA total isolado e a expressão de citocinas analisada por RealTimePCR (Fig. 4). Nos animais infectados detectamos intensa expressão de TNF- α , IL-1 β e IFN- γ nos tempos de 1, 7 e 15 dias após a infecção (p<0.001 vs 0h), a qual declinava para níveis significativamente menores nos tempos de 30d e 60d (p<0.001 vs tempos indicados). Porém, tal expressão ainda se



Figura 04 - Cinética de expressão de citocinas nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans.* Amostras de tecido periodontal de camundongos C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A. actinomycetemcomitans,* foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL12, IL-4 e IL-10 foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média \pm SD, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. *p<0.05 vs a 0h, **p<0.05 vs tempos indicados.

encontrava em níveis significativamente maiores que no tempo de 0h (p<0.001 vs 0h). Com relação a expressão de IL-12, esta apresenta um pico de expressão 1 dia após a infecção (p<0.001 vs 0h; p<0.001 vs tempos indicados), e se mantém em níveis mais baixos no período entre 7 e 60 dias de infecção (p<0.001 vs 0h) (Fig. 4). Mensagens para IL-10 foram detectadas em baixos níveis nos tempos de 7 e 15 dias (p<0.001 vs 0h), enquanto um significativo aumento em sua expressão foi verificado nos tempos de 30d e 60d pós-infecção (p<0.001 vs 0h; p<0.001 vs 0h; p<0.001 entre tempos selecionados). A expressão de mRNA para IL-4 foi detectada apenas 30 e 60 dias pi (p<0.001 vs 0h), em níveis similares (Fig. 4). Nos tecidos periodontais de animais dos grupos controle (não infectados e sham-infectados) não foi detectada a expressão de mRNA para nenhuma das citocinas investigadas nos tempos analisados (dados não mostrados). A expressão do gene constitutivo beta-actina foi verificada em todos os tempos analisados (dados não mostrados), sendo utilizada como controle positivo da reação e para normalização dos níveis de expressão de mRNA .

A cinética de produção de TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-4 e IL-10 nos tecidos periodontais durante o curso da DP experimental também foi analisado por ELISA (Fig. 5). Nossos resultados confirmam aqueles relativos a expressão de mRNA para tais citocinas, demonstrando altos níveis de TNF- α , IL-1 β e IFN- γ aos 1, 7 e 15 dias após a inoculação dos microrganismos, e menores níveis de tais citocinas nos tempos de 30 e 60 dias de infecção (p<0.001 vs 0h; p<0.001 vs tempos indicados). Também constatamos altos níveis de IL-4 e IL-10 nos tecidos periodontais dos camundongos infectados aos 30 e 60 dias de infecção (p<0.001 vs 0h; p<0.001 vs tempos indicados)(Fig. 5).

4.5. Cinética de expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*



Figura 05 - Níveis de citocinas nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans.* Amostras de tecido periodontal palatino de camundongos C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal foram coletadas, pesadas e homogenizadas, sendo o sobrenadante analisado quanto aos níveis de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10 por ELISA. Os resultados são expressos como pg de citocina por mg de tecido por animal, e representam os valores (média ± SD), provenientes de 2 animais por grupo em cada tempo, representativos de 3 experimentos independentes. *p<0.05 vs a 0h, **p<0.05 vs tempos indicados.

Além das citocinas, quimiocinas e seus receptores também estão supostamente envolvidos na patogênese das DPs. Buscando caracterizar a cinética de expressão de tais fatores durante o curso da doença, tecidos periodontais de camundongos C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de DP foram analisados com relação a expressão de mRNA para quimiocinas e seus receptores (Fig.s 6 e 7). Mensagens para a quimiocina CXCL3 podem ser detectadas em altos níveis 1 dia pós-infecção (p<0.001 vs 0h), sendo que nos demais tempos analisados (de 7 a 60d pi) apenas uma discreta expressão foi detectada. A expressão de CXCL1 foi detectada constitutivamente em baixos níveis no tempo de 0h, em altos níveis 1 dia pi (p<0.001 vs 0h). Durante o curso da doença, tal quimiocina ainda pode ser detectada aos 15, 30 e 60d após a inoculação dos microrganismos (p<0.001 vs 0h), mas em níveis significativamente menores do que 1 dia pi (p<0.05) (Fig. 6). A expressão do receptor CXCR2, cujos ligantes incluem CXCL1 e CXCL3, foi detectada em baixos níveis no tecido normal (0h), apresentado um pico de expressão 1d pi (p<0.001 vs 0h; p<0.001 vs tempos indicados). Em seguida, a expressão de CXCR2 apresentou reduções gradativas aos 7 (p<0.001 vs 0h) e 15d (p<0.001 vs 0h), se mantendo então constante até 60d pi (p<0.001 vs 0h) (Fig. 7).

As mensagens para as quimiocinas CCL3 e CCL5 apresentaram um padrão similar de expressão, sendo mais intensa no período entre 1 e 15 d (p<0.001 vs 0h; p<0.001 vs tempos indicados), e significativamente reduzida aos 30 e 60 dias pi (p<0.001 vs 0h) (Fig. 6). Também verificamos a expressão de CCR5 em níveis baixos nos tempos de 0 e 1d, enquanto um aumento significativo foi verificado aos 7 e 15d pi (p<0.001 vs 0h). A expressão de CCR5 também é detectada nos tempos de 30d e 60d (p<0.001 vs 0h; p<0.001 vs tempos indicados), sendo tal expressão neste período menor que nos tempos anteriores (Fig. 7). CXCL10 foi detectada em altos níveis aos tempos de 1, 7 e 15d (p<0.001 vs 0h) e apresenta uma

★p<0.05 vs 0h ★ ★p<0.05





CXCL10

**

Intensidade de expressão mRNA (normaliz. B-actina)

3

2

1

0

0h 1d

7d

15d

Tempo pós infecção

30d

60d



CXCL1

**

3

2

0

0h

1d

7d

Tempo pós-infecção

15d

30d

60d



Figura 06 - Cinética de expressão de quimiocinas nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans*, foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de CXCL3, CXCL1, CCL3, CCL5, CXCL10 e CCL1 foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média ± SD, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. *p<0.05 vs a 0h, **p<0.05 vs tempos indicados.



Figura 07 - Cinética de expressão de receptores de quimiocinas nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans*, foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de CXCR2, CXCR3, CCR5 e CCR4 foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média \pm SD, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. *p<0.05 vs a 0h, **p<0.05 vs tempos indicados.

diminuição na sua expressão aos 30 e 60d pi (p<0.001 vs 0h; p<0.001 vs tempos indicados) pós infecção. A expressão de CXCR3, receptor de CXCL10, foi detectada em níveis muito baixos 0h e 1d pi, e em níveis elevados nos tempos de 7 e 15d (p<0.001 vs 0h); enquanto uma significativa redução em sua expressão foi verificada aos 30 e 60d pi (p<0.001 vs 0h; p<0.001vs tempos indicados)(Fig. 7).

Por outro lado, a cinética de expressão de CCL1 é completamente distinta, sendo detectada em baixos níveis aos 15d pós infecção (p<0.001 vs 0h), e apresenta um aumento significativo em seu nível de expressão nos tempos de 30d e 60d (p<0.001 vs 0h; p<0.001 entre tempos selecionados). A expressão de CCR4, receptor de CCL1, foi detectada em baixos níveis no período entre 0h a 15d, enquanto um aumento significativo foi verificado aos 30 e 60d pi (p<0.001 vs 0h; p<0.001 vs tempos indicados)(Fig.s 6 e 7). Nos tecidos periodontais de animais dos grupos controle (não infectados e sham-infectados) não foi detectada a expressão de mRNA para nenhuma das quimiocinas e receptores de quimiocinas investigados nos tempos analisados (dados não mostrados). A expressão do gene constitutivo beta-actina foi verificada em todos os tempos analisados (dados não mostrados), sendo utilizada como controle positivo da reação e para normalização dos níveis de expressão de mRNA.

4.6. Cinética de expressão de metaloproteases (MMPs) e seus inibidores (TIMPs) nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*

Acredita-se que o balanço entre a expressão de MMPs e TIMPs esteja envolvida na patogênese das DPs, entretanto, sua cinética de expressão, assim como sua relevância para a progressão da doença não são conhecidos. Nesse sentido, investigamos a expressão de tais fatores nos tecidos periodontais de camundongos C57BL/6 durante o curso da DP experimental (Fig.8). Nossos resultados demonstram que a expressão de MMPs (MMP-1,

MMP-2, MMP-9) e TIMPs (TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3) foi detectada em baixos níveis nos tecidos normais (0h), assim como nos animais não infectados e sham-infectados (dados não mostrados). Durante o curso da doença, detectamos uma intensa expressão de MMP-1, MMP-2 e MMP-9 nos tempos de 1, 7 e 15d pi (p<0.001 vs 0h), e uma significativa diminuição em sua expressão aos 30 e 60d após a inoculação dos microrganismos (p<0.001 vs 0h; p<0.001 vs tempos indicados)(Fig.8). Por outro lado, a expressão de TIMPs (TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3) apresentou um discreto aumento no período entre 1 e 15d pi, e um significativo aumento aos 30 e 60 dias de infecção (p<0.001 vs 0h; p<0.001 vs tempos indicados) (Fig.8). A expressão do gene constitutivo beta-actina foi verificada em todos os tempos analisados (dados não mostrados), sendo utilizada como controle positivo da reação e para normalização dos níveis de expressão de mRNA.

4.7. Cinética de expressão de RANKL e OPG nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*

Uma vez que a reabsorção óssea alveolar é um evento chave na patogênese das DPs, nosso próximo objetivo foi caracterizar a cinética de expressão de fatores envolvidos na diferenciação e ativação de osteoclastos (Fig. 9). Nossos resultados demonstram que a expressão de RANKL foi detectada inicialmente 1 dia após a infecção (p<0.001 vs 0h), estando significativamente aumentada aos 7 e 15d pi (p<0.001 vs 0h), e significativamente reduzida aos 30 e 60 dias após a inoculção dos microrganismos (p<0.001 vs 0h; p<0.001 vs tempos indicados). Ao contrário, a expressão de OPG foi detectada em baixos níveis no tempo de 0h (Fig. 9), assim como sendo constitutivamente expressa nos animais não infectados e sham-infectados (dados não mostrados). Também constatamos um discreto aumento na expressão de OPG no período entre 1 e 15d pi, e um significativo aumento em tal expressão foi verificado aos 30 e 60 di pi (p<0.001 vs 0h; p<0.001 vs tempos indicados). A



Figura 08 - Cinética de expressão de metaloproteases (MMPs) e inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans*, foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média ± SD, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. *p<0.05 vs a 0h, **p<0.05 vs tempos indicados.



Figura 09 - Cinética de expressão de RANKL, OPG e catepsina K nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans*, foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de RANKL, OPG e catesina K foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média ± SD, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. *p<0.05 vs a 0h, **p<0.05 vs tempos indicados.

expressão de catepsina K foi detectada em altos níveis aos 7 e 15d pi, e uma significativa redução foi verificada nos aos 30d e 60d após a inoculação dos microrganismos (p<0.001 vs 0h; p<0.001 vs tempos indicados). Nos tecidos periodontais de animais dos grupos controle (não infectados e sham-infectados) não foi detectada a expressão de mRNA para RANKL e catepsina K nos tempos analisados (dados não mostrados). A expressão do gene constitutivo beta-actina foi verificada em todos os tempos analisados (dados não mostrados), sendo utilizada como controle positivo da reação e para normalização dos níveis de expressão de mRNA.

4.8. Análise de correlação entre os níveis de expressão de MMP, TIMPs, RANKL e OPG, com a expressão de citocinas durante o curso da doença periodontal experimental

Buscando estabelecer paralelos entre os padrões de expressão de citocinas e de fatores potencialmente envolvidos na destruição dos tecidos periodontais, nosso próximo passo foi investigar possíveis correlações entre os níveis de expressão de MMPs, TIMPs, RANKL e OPG e as citocinas expressas nos tecidos periodontais durante o curso da DP experimental (Fig. 10). Analisados com os testes de regressão linear e o teste de correlação de Person, nossos resultados demonstram correlações positivas entre a expressão de IFN-γ e MMP-1 (P=0.0044, R=0.9453), IFN-γ e MMP-2 (P=0.0111, R=0.9126), IFN-γ e MMP-9 (P=0.0112, R=0.9121), IFN-γ e RANKL (P=0.0023, R=0.9608), TNF-α e MMP-1 (P<0.001, R=0.9940), TNF-α e MMP-2 (P=0.0036, R=0.9505), TNF-α e MMP-9 (P=0171, R=0.9505), TNF-α e RANKL (P=0.0020, R=0.9629), IL-1-β e MMP-1 (P=0.0017, R=0.9666), IL-1-β e MMP-2 (P=0.0131, R=0.9051), IL-1-β e RANKL (P=0.0360, R=0.8407), IL-4 e TIMP-1 (P<0.0068, R=0.9318), IL-4 e TIMP-3 (P=0.0056, R=0.9381), IL-4 e OPG (P=0.0039, R=0.9487), IL-10 e TIMP-1 (P=0.0381, R=0.9349), IL-10 e TIMP-3 (P=0.0381, R=0.9349), IL-10 e OPG (P=0.0018, R=0.9648).

Resultados 49



Figura 10 – Correlação entre a expressão de mRNA para MMPs, TIMPs, RANKL e OPG e a expressão de citocinas nos tecidos periodontais durante o curso da DP experimental. Possíveis correlações entre os níveis de expressão de mRNA para MMPs, TIMPs, RANKL e OPG e a expressão das citocinas IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10 nos tecidos periodontais durante o curso da DP experimental foram examinados através da análise de correlação de Spearman e de regressão linear. Os eixos X e Y representam os níveis de expressão do gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina. Valores considerados estatisticamente significantes estão indicados nos gráficos.

4.9. Quantificação de *A. actinomycetemcomitans* nos tecidos periodontais durante o curso da doença periodontal experimental

Um ponto crítico na patogênese das DPs, porém raramente investigado em modelos experimentais, diz respeito ao controle da infecção periodontal. Buscando caracterizar a cinética de infecção no curso da DP experimental, camundongos C57BL/6 que receberam a inoculação oral de *A. actinomycetemcomitans* tiveram amostras de tecido periodontal palatino coletadas, pesadas, homogeneizadas, sendo então o DNA bacteriano extraído e quantificado por RealTimePCR (Fig. 11). Verificamos que a presença de *A. actinomycetemcomitans* já era detectável nos tecidos periodontais 1 dia após a infecção, porém, em baixos níveis (p<0.001 vs 0h). Seguindo o curso da infecção, verificamos um crescente aumento na carga bacteriana nos tecidos periodontais aos 7 (p<0.001 vs 0h) e 15d pi (p<0.001 vs 0h), sendo que aos 30 e 60 dias após a inoculção dos microrganismos o nível de detecção de DNA de *A. actinomycetemcomitans* se mostrou similar aquele visto aos 15 dias de infecção (p<0.001 vs 0h; p<0.001 vs tempos indicados).

4.10. Efeitos sistêmicos da infecção por *A. actinomycetemcomitans* durante o curso da doença periodontal experimental

Estudos recentes tem sugerido que as DPs podem levar a uma resposta inflamatória sistêmica do hospedeiro, interferindo em sua saúde e até mesmo agravando ou predispondo a ocorrência de diversos estados patológicos. Buscando investigar possíveis efeitos sistêmicos da DP experimental, camundongos C57BL/6 infectados com *A.actinomycetemcomitans* foram analisados com relação à resposta de fase aguda, assim como quanto ao ganho de peso durante o curso da doença (Fig. 11). Nossos resultados demonstram uma significativa expressão de proteína C reativa (CRP) no figado dos animais aos 7, 15, 30 e 60 dias após a infecção (p<0.001 vs 0h). No figado de animais dos grupos controle (não infectados e sham-



Figura 11 - Quantificação da carga bacteriana nos tecidos periodontais, e resposta sistêmica à infecção experimental por *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans*, foram analisados quanto a carga bacteriana nos tecidos periodontias (média \pm SD níveis de expressão de DNA de *A. actinomycetemcomitans*, RealTimePCR); resposta de fase aguda (média \pm SD níveis de expressão de mRNA de CRP no fígado; média \pm SD dos níveis de CRP em µg/ml soro), assim como quanto ao ganho de peso durante o curso da doença (média \pm SD do peso de 3 camundongos em cada tempo analisado). Resultados representativos de 3 experimentos independentes. *p<0.05 vs a 0h, **p<0.05 vs tempos indicados.

infectados) não foi detectada a expressão de mRNA para CRP nos tempos analisados (dados não mostrados). A expressão do gene constitutivo beta-actina foi verificada em todos os tempos analisados (dados não mostrados), sendo utilizada como controle positivo da reação e para normalização dos níveis de expressão de mRNA. Também detectamos a presença de CRP no soro dos animais infectados a partir de 7 dias pi, e durante todo o curso da infecção (p<0.001 vs 0h). Não foi detectada CRP no soro dos animais dos grupos controle (não infectados e sham-infectados) nos tempos analisados (dados não mostrados). Ao analisarmos o ganho de peso dos animais durante o curso da infecção, não verificamos diferenças entre os animais infectados e não infectados (Fig. 11).

4.11. Níveis de expressão de oxido nítrico sintetase induzível (iNOS) nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*

Estudos demonstram que a produção de óxido nítrico (NO) mediada pela enzima iNOS pode matar certos periodontopatógenos, estando este mediador potencialmente envolvido no controle da infecção periodontal. Nesse sentido, camundongos C57BL/6 infectados com *A.actinomycetemcomitans* foram analisados quanto aos níveis de expressão de iNOS nos tecidos periodontais (Fig. 12). Nossos resultados demonstram que a expressão de iNOS foi detectada no tecido periodontal dos animais infectados 1 dia após a inoculação dos microrganismos, e durante todo o curso da doença (p<0.001 vs 0h; p<0.001 vs tempos indicados).

4.12. Níveis de mieloperoxidase (MPO) nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*

Pouco se sabe a respeito dos mecanismos envolvidos no controle da infecção periodontal, mas acredita-se que mediadores antimicrobianos produzidos por neutrófilos participem desse



Figura 12 - Produção de mediadores antimicrobianos durante o curso da doença periodontal experimental induzida por *Actinobacillus actinomycetemcomitans.* Camundongos C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A. actinomycetemcomitans* foram analisados quanto a da expressão de mRNA para iNOS (média ± SD, da intensidade de expressão de mRNA, normalizado pela beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo), níveis MPO nos tecidos periodontais (média ± SD da DO referente a atividade de MPO nos tecidos periodontais por animal, normalizados pelo peso do tecido, pool de 5 animais em cada tempo). Amostras de soro foram utilizadas para a detecção de anticorpos específicos para *A. actinomycetemcomitans* por ELISA (média ± SD, dos títulos de anticorpos específicos para *A. actinomycetemcomitans*, obtidos de 3 animais em cada tempo). Resultados representativos de 3 experimentos independentes.*p<0.05 vs a 0h, **p<0.05 vs tempos indicados.

processo. Nesse sentido, analisamos os níveis de MPO nos tecidos periodontais de camundongos C57BL/6 infectados com *A. actinomycetemcomitans* (Fig. 12). Nossos resultados demonstram que uma intensa atividade de MPO foi detectada nos tecidos periodontais 1 dia após a infecção (p<0.001 vs 0h), sendo que uma gradativa diminuição nos níveis de MPO foi verificada aos 7 e 15 dias pi (p<0.001 vs 0h), sendo então detectada em níveis similares aos 30 e 60 após a inoculação dos microrganismos (p<0.001 vs 0h; p<0.001 vs

4.13. Detecção quantificação de anticorpos específicos para *A. actinomycetemcomitans* no soro dos camundongos infectados durante o curso da doença periodontal experimental

Em certos estudos, o desenvolvimento de resposta imune humoral se mostra protetor com relação à progressão da DP. Buscando caracterizar a produção de imunoglobulinas durante o curso da DP experimental, camundongos C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de DP tiveram seu sangue colhido em diferentes dias durante o curso da infecção, sendo o soro separado e utilizado para a detecção de anticorpos específicos para A. actinomycetemcomitans por ELISA (Fig. 12). Verificamos que anticorpos (IgG total) específicos para A. actinomycetemcomitans foram detectados inicialmente aos 15 dias pósinfecção (p<0.001 vs 0h), porém em baixos títulos. Aos 30 e 60 dias pi, os títulos de IgG específica A. actinomycetemcomitans foram detectados para em altos títulos. significativamente maiores que tempo anterior (p<0.001 vs 0h; p<0.001 vs tempos indicados). Não foram detectados anticorpos A. actinomycetemcomitans específicos no soro animais dos grupos controle (não infectados e sham-infectados)(dados não mostrados).

4.14. Papel do TNFp55 na modulação da reação inflamatória e perda óssea alveolar induzida por *A. actinomycetemcomitans*

Buscando investigar o papel de TNFp55 na determinação da severidade da doença periodontal, inicialmente analisamos a resposta inflamatória e a reabsorção óssea alveolar em camundongos TNFp55-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans* (Fig.13). Nossos resultados demonstram uma significativa redução no numero absoluto de leucócitos extraídos do tecido gengival dos animais TNFp55-KO aos 7 (P<0.01 vs WT), 15 (P<0.001 vs WT), 30 (P<0.001 vs WT) e 60 dias (P<0.001 vs WT) após a infecção, quando comparados aos animais WT infectados com *A. actinomycetemcomitans* (Fig. 13). De acordo com tal resultado, a análise histológica dos tecidos periodontais dos animais TNFp55KO demonstra uma menor quantidade de células inflamatórias no tecido conjuntivo periodontal, quando comparado aos animais WT (Fig. 14). Com relação à reabsorção óssea, constatamos que os animais TNFp55-KO apresentaram uma significativa redução na área entre a junção amelo-cementária (JAC) e a crista óssea alveolar (COA) aos 15 (P<0.05 vs WT), 30 (P<0.001 vs WT), 45 (P<0.001 vs WT) e 60 dias (P<0.001 vs WT) pi, quando comparados aos animais mão infectados e sham-infectados não apresentaram perda óssea no período estudado (Fig.13).

4.15. Papel de TNFp55 na migração celular para os tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*

Nosso próximo passo foi investigar o fenótipo das células constituintes do infiltrado celular inflamatório nos tecidos periodontais de camundongos TNFp55-KO submetidos ao protocolo de indução de DP (Fig.15). Nossos resultados demonstram que animais TNFp55-KO apresentavam um menor número de neutrófilos (GR1+) nos tempos de 1 (P<0.001 vs WT), 7 (P<0.01 vs WT) e 15 (P<0.05 vs WT) dias após a infecção. Ao compararmos o número de macrófagos (F4/80+) nos tecidos periodontais dos animais TNFp55-KO e WT, constatamos que aos 7 (P<0.01), 15 (P<0.001 vs WT), 30 (P<0.001 vs WT) e 60 (P<0.001 vs



Figura 13 – Reação inflamatória e perda óssea alveolar induzida por *A. actinomycetemcomitans* em animais TNFp55-KO. Camundongos TNFp55-KO e C57BL/6 (WT) submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans*, grupos controle de animais não infectados e sham-infectados, foram analisados quanto a cinética de desenvolvimento de reação inflamatória nos tecidos periodontais e perda óssea alveolar. A) Número de leucócitos extraídos através de digestão enzimática do tecido periodontal, corados com azul de tripam e contados em câmara de Neubauer. B) Aumento da distância JAC-COA na face palatina dos molares, em relação aos animais controle, medida em unidades arbitrárias de área (UAA) com o programa ImageTool 2.0. Os resultados apresentados representam os valores da média ± SD, da área JAC-COA (obtidos de 3 animais) ou número de células por animal (obtidos de 5 animais) em cada tempo, representativos de três experimentos independentes. *P<0.05 vs WT.
Resultados 57



Figura 14 - Análise histopatológica dos tecidos periodontais de camundongos TNFp55KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Camundongos TNFp55-KO e C57BL/6 (WT) submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans* foram sacrificados após 0h (A-TNFp55-KO; B-WT) e 60 (C-TNFp55-KO; D-WT) dias de infecção. Amostras de tecido periodontal coletadas, fixadas em paraformaldeído, desmineralizadas com ácido tricloroacético, inclusos em blocos de parafina. Cortes de 5 μm de espessura foram obtidos com auxílio de um micrótomo, corados com hematoxilina e eosina, e submetidos a análise histopatológica. Aumento original 40X. Resultados obtidos de dois animais de cada grupo experimental, representativos de 3 experimentos independentes.



Figura 15 - Análise fenotípica dos leucócitos extraídos dos tecidos periodontais de camundongos TNFp55-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal palatino de camundongos TNFp55-KO e C57BL/6 (WT) submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans* foram coletadas, submetidas à digestão enzimática, e a contagem de células realizada em câmara de neubauer. Para as análises de citometria de fluxo, 1x10⁶ cel/ml células foram incubadas com anticorpos conjugados a PE ou FITC, específicos para os seguintes marcadores: CD3, CD4, CD8, GR1 e F4/80, e a análise realizada em FACScan utilizando-se parâmetros de tamanho (FSC), granularidade (SSC), e fluorescência (FL1 e FL2). O número absoluto das células GR1+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, F4/80+, CD19+, foi calculado proporcionalmente em relação ao número de células totais. Os resultados representam os valores da média ± SD, do número de células por animal, provenientes de dois experimentos independentes. *p<0.001 vs WT.

WT) dias pi, o número de tais células era significativamente menor nos animais TNFp55-KO (Fig.15). Também constatamos que o número de linfócitos CD4 se mostrava reduzido nos tecidos periodontais dos animais TNFp55-KO aos 7 (P<0.001 vs WT), 15 (P<0.001 vs WT), 30 (P<0.001 vs WT) e 60 (P<0.001 vs WT) dias após a inoculação dos microrganismos. Com relação aos linfócitos CD8, constatamos que 1 e 7 dias após a infecção tais células se encontravam em números similares nos animais TNFp55-KO e WT, enquanto que aos 15 (P<0.001 vs WT), 30 (P<0.001 vs WT) e 60 (P<0.001 vs WT) e 60 (P<0.001 vs WT) dias pi, o número de tais células se mostrava significativamente menor nos animais TNFp55-KO. Ao analisarmos o número de linfócitos B (células CD19+), verificamos que os animais TNFp55-KO apresentavam uma redução significativa no número de tais células nos tempos aos 30 (P<0.01 vs WT) e 60 (P<0.001 vs WT) dias pi, o número de tais células se mostrava significativamente menor nos animais TNFp55-KO. Ao analisarmos o número de linfócitos B (células CD19+), verificamos que os animais TNFp55-KO apresentavam uma redução significativa no número de tais células nos tempos aos 30 (P<0.01 vs WT) e 60 (P<0.001 vs WT) dias pi (Fig.15).

4.16. Papel de TNFp55 na modulação da expressão de citocinas nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*

Investigamos em seguida o papel de TNFp55 na modulação da expressão de citocinas nos tecidos periodontais de camundongos TNFp55-KO submetidos ao protocolo de indução de DP (Fig.16). Nossos resultados demonstram que a expressão de IL-1 β se mostrava significativamente reduzida aos 7 (P<0.001 vs WT) e 15 dias pi (P<0.001 vs WT) nos animais TNFp55-KO, enquanto nos tempos de 30 e 60 dias pós-infecção, uma pequena redução na expressão de IL-1 β foi constatada, porém sem diferenças estatisticamente significativas. Constatamos também que a expressão de IFN- γ se mostrava significativamente reduzida nos animais TNFp55-KO nos tempos de 7 (P<0.001 vs WT), 15 (P<0.001 vs WT) e 30 dias (P<0.05 vs WT) após a infecção (Fig.16). Ao analisarmos os níveis de expressão de IL-12 e IL-4 durante o curso da DP nos animais TNFp55-KO, não foram verificadas diferenças em relação à expressão de tais citocinas nos animais WT, em nenhum dos tempos analisados



Figura 16 – Cinética de expressão de citocinas nos tecidos periodontais de camundongos TNFp55-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos TNFp55-KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans* foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de IL-1 β , IFN- γ , IL12, IL-4 e IL-10 foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média \pm SD, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. *p<0.05 vs WT.

(Fig.16). Com relação à expressão de IL-10, constatamos uma expressão significativamente mais intensa de tal citocina nos animais TNFp55-KO aos 7 (P<0.001 vs WT), 15 (P<0.001 vs WT), 30 (P<0.01 vs WT) e 60 (P<0.01 vs WT) dias após a inoculação dos microrganismos (Fig.16). A expressão do gene constitutivo beta-actina foi verificada em todos os tempos analisados (dados não mostrados), sendo utilizada como controle positivo da reação e para normalização dos níveis de expressão de mRNA.

Também analisados a produção de IL-1 β , IFN- γ , IL-4 e IL-10 nos tecidos periodontais dos animais TNFp55KO durante o curso da DP experimental, através de ELISA (Fig. 17). Nossos resultados confirmam aqueles relativos a expressão de mRNA para tais citocinas, demonstrando uma redução significativa nos níveis de IL-1 β e IFN- γ aos 15 dias após a inoculação dos microrganismos (P<0.05 vs WT), enquanto um aumento nos níveis de IL-10 foi verificado 60 dias após a infecção (P<0.05 vs WT). Nossos resultados não demonstram alterações significativas nos níveis de IL-4 nos tecidos periodontais dos animais TNFp55KO durante o curso da infecção (Fig.17).

4.17. Papel de TNFp55 na modulação da expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A*. *actinomycetemcomitans*

Investigamos também o papel de TNFp55 na modulação da expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas nos tecidos periodontais de camundongos TNFp55-KO submetidos ao protocolo de indução de DP (Fig. 18 e 19). Verificamos que nos animais TNFp55-KO, a expressão de CXCL3 se mostrava significativamente reduzida no tempo de 24 pós-infecção (P<0.001 vs WT), quando comparada aos animais WT. Nossos resultados também demonstram um redução significativa na expressão de CXCL1 aos tempos de 1 (P<0.001 vs WT), 7 (P<0.001 vs WT), 15 (P<0.001 vs WT) e 30 (P<0.001 vs WT) dias pi



Figura 17 - Níveis de citocinas nos tecidos periodontais de camundongos TNFp55-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans.* Amostras de tecido periodontal palatino de camundongos TNFp55-KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal foram coletadas, pesadas e homogenizadas, sendo o sobrenadante analisado quanto aos níveis de IL-1β, IFN-γ, IL-4 e IL-10 por ELISA. Os resultados são expressos como pg de citocina por mg de tecido por animal, e representam os valores (média + desvio padrão), provenientes de 2 animais por grupo em cada tempo, representativos de 3 experimentos independentes. *p<0.05 vs WT.



Figura 18 - Cinética de expressão de quimiocinas nos tecidos periodontais de camundongos TNFp55-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos TNFp55-KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans* foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de CXCL3, CXCL1, CCL3, CCL5, CXCL10 e CCL1 foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média ± SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. *p<0.05 vs WT.



Figura 19 - Cinética de expressão de receptores de quimiocinas nos tecidos periodontais de camundongos TNFp55-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos TNFp55-KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans* foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de CXCR2, CXCR3, CCR5 e CCR4 foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média ± SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. *p<0.05 vs WT.

(Fig.18). Com relação a expressão de CXCR2, receptor de CXCL3 e CXCL1, constatamos que sua expressão se mostrava significativamente reduzida nos animais TNFp55-KO tempos de 1 (P<0.001 vs WT), 7 (P<0.01 vs WT) e 15 (P<0.05 vs WT) dias após a infecção, quando comparados aos animais WT. Quando analisada aos 30 e 60 dias de infecção, verificamos que a intensidade de expressão de CXCR2 apresentava se mostrava similar aquela vista nos animais WT (Fig.19). Analisando a expressão de CCL3, constatamos que nos animais TNFp55-KO a expressão de tal quimiocina se mostrava significativamente reduzida nos animais aos tempos de 1 (P<0.05 vs WT), 7 (P<0.05 vs WT), 15 (P<0.05 vs WT) e 30 (P<0.05 vs WT) dias pós-infecção, quando comparado aos camundongos WT (Fig.18).

Verificou-se também que a expressão de CCL5 e CCR5 também se encontrava significativamente reduzida nos animais TNFp55-KO, aos tempos de 7, 15, 30 e 60 dias de infecção (P<0.05 vs WT) (Fig.18 e 19). Nossos resultados também demonstram uma redução significativa na expressão de CXCL10 (nos tempos de 1, 7, 15 e 60 dias pi) e seu respectivo receptor CXCR3 (nos tempos de 7, 15, 30 e 60 dias pi) nos animais TNFp55-KO quando comparados aos animais WT (P<0.05 vs WT) (Fig.19). Analisando a expressão de CCL1 e seu receptor CCR4, verificamos que a expressão de tais fatores era similar entre os animais TNFp55-KO e WT em todos os tempos analisados, a exceção do tempo de 15 dias, no qual a expressão de CCL1 se mostrava aumentada nos animais TNFp55-KO (P<0.05 vs WT) (Fig.18 e 19). A expressão do gene constitutivo beta-actina foi verificada em todos os tempos analisados (dados não mostrados), sendo utilizada como controle positivo da reação e para normalização dos níveis de expressão de mRNA.

4.18. Papel de TNFp55 na modulação da expressão MMPs, RANKL e seus respectivos inibidores (TIMPs e OPG) nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A*. *actinomycetemcomitans*

Uma vez que TNF-α parece modular a destruição dos tecidos periodontais, nosso próximo passo foi analisar a expressão de MMPs, RANKL e seus respectivos inibidores durante o curso da DP experimental (Fig. 20 e 21). Nossos resultados demonstram uma menor expressão de MMP-1 (nos tempos de 24h, 7, 15 e 60 dias, p<0.001 vs WT), MMP-2 (nos tempos de 7, 15 e 60 dias, p<0.001 vs WT), quando comparada a expressão vista nos animais WT (Fig.20). Ao analisarmos a expressão de TIMPs, verificamos que nos animais TNFp55-KO a expressão de TIMP-1 se mostrava aumentada nos tempos de 7, 15 e 30 dias pós infecção (p<0.001 vs WT), enquanto que nos demais tempos não foram encontradas diferenças entre os animais TNFp55KO e WT (Fig.20). Com relação a expressão de TIMP-2, nossos resultados demonstram uma expressão similar entre os animais TNFp55-KO e WT aos tempos de 1, 7 e 15 dias pi, enquanto aos 30 e 60 dias de infecção um aumento significativo (p<0.001 vs WT) foi verificado nos animais TNFp55-KO (Fig.20). Ao analisarmos os níveis de expressão de TIMP-3, constatamos um aumento significativo em sua expressão nos animais TNFp55-KO aos 15, 30 e 60 dias pi, quando comparados aos animais WT (Fig.20).

Nossos dados também demonstram uma redução significativa na expressão de RANKL nos animais TNFp55-KO comparados aos camundongos WT infectados, aos 7 (p<0.001 vs WT), 15 (p<0.001 vs WT), 30 (p<0.01 vs WT) e 60 (p<0.05 vs WT) dias após a infecção (Fig.21). Também constatamos uma menor expressão de catepsina K nos tecidos periodontais dos animais TNFp55-KO nos tempos de 7 (P<0.01 vs WT) e 15 (P<0.01 vs WT) dias pós infecção, enquanto que aos 30 e 60 dias, apenas uma discreta redução, sem significância estatística, foi verificada (Fig.21). Ao compararmos os níveis de expressão de OPG nos animais TNFp55-KO e WT infectados com *A. actinomycetemcomitans*, nossos resultados demonstram uma expressão significativamente aumentada de tal fator nos animais



Figura 20 - Cinética de expressão de metaloproteases (MMPs) e inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) nos tecidos periodontais de camundongos TNFp55-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos TNFp55-KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans* foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média ± SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. *p<0.05 vs WT.



Figura 21 - Cinética de expressão de RANKL, OPG e catepsina K nos tecidos periodontais de camundongos TNFp55-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos TNFp55-KO e C57BL/6 submetidos_ao_protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans* foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de RANKL, OPG e catesina K foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média \pm SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. *p<0.05 vs WT.

TNFp55-KO nos tempos de 7 e 15 dias pós-infecção (P<0.01 vs WT), enquanto que nos demais tempos analisados não foram encontradas diferenças significativas (Fig.21). A expressão do gene constitutivo beta-actina foi verificada em todos os tempos analisados (dados não mostrados), sendo utilizada como controle positivo da reação e para normalização dos níveis de expressão de mRNA.

4.19. Papel do TNFp55 na modulação da infecção experimental por *A*. *actinomycetemcomitans*

Nosso próximo passo foi a análise da resistência de camundongos TNFp55-KO à infecção por A. actinomycetemcomitans (Fig. 22). Nossos dados demonstram que a detecção de DNA de A. actinomycetemcomitans nos tecidos periodontais dos animais TNFp55-KO foi significativamente maior do que nos animais WT, sendo tal diferença estatisticamente significativo aos 7 (P<0.01 vs WT), 15 (P<0.01 vs WT), 30 (P<0.01 vs WT) e 60 (P<0.01 vs WT) dias após a infecção. Também constatamos que nos animais TNFp55-KO infectados com A. actinomycetemcomitans a expressão de CRP no figado dos animais era significativamente maior que nos animais WT aos 7 (P<0.001 vs WT), 15 (P<0.001 vs WT), 30 (P<0.001 vs WT) e 60 (P<0.001 vs WT) dias após a infecção (Fig.22). Além disso, os níveis de proteína C reativa no soro dos animais TNFp55-KO se mostravam significativamente maiores aos dos animais WT infectados, aos tempos de 15 (P<0.01), 30 (P<0.01) e 60 (P<0.01) dias pi (Fig.22). Acompanhando o ganho de peso dos animais durante o curso da infecção, constatamos que os animais TNFp55-KO infectados com A. actinomycetemcomitans apresentavam uma redução do ganho de peso durante o curso da doença quando comparados aos animais não infectados, evidente aos 30 e 60 dias (P<0.05 vs controle) pi (Fig.22). Não foram verificadas alterações no ganho de peso apresentado pelos





Figura 22 - Quantificação da carga bacteriana nos tecidos periodontais, e resposta sistêmica à infecção de camundongos TNFp55-KO por *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos TNFp55-KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans* foram analisados quanto a carga bacteriana nos tecidos periodontias (média \pm SD níveis de expressão de DNA de *A. actinomycetemcomitans*, RealTimePCR); resposta de fase aguda (média \pm SD níveis de expressão de mRNA de CRP no fígado; média \pm SD dos níveis de CRP em µg/ml soro), assim como quanto ao ganho de peso durante o curso da doença (média \pm SD do peso de 3 camundongos em cada tempo analisado). Resultados representativos de 3 experimentos independentes. *p<0.05 vs WT.

animais TNFp55-KO sham-infectados, durante o período analisado (dados não mostrados). Também não foi constatada mortalidade de animais TNFp55-KO ou WT, infectados, não infectados ou sham-infectados até 60 dias após a infecção (dados não mostrados).

4.20. Papel do TNFp55 na modulação de fatores antimicrobianos durante o curso da doença periodontal experimental induzida por *A. actinomycetemcomitans*

Investigando os possíveis mecanismos envolvidos no aumento da suscetibilidade de camundongos TNFp55-KO à infecção por *A. actinomycetemcomitans*, tais animais foram analisados com relação à expressão de iNOS, produção de mieloperoxidase (MPO), assim como quanto a produção de anticorpos específicos para *A. actinomycetemcomitans* durante o curso da doença (Fig.23). Nossos resultados demonstram que a expressão de iNOS se encontrava significativamente reduzida nos tecidos periodontais dos animais TNFp55-KO (P<0.05 vs WT) em todos os tempos analisados, quando comparados aos animais WT. Além disso, verificamos que a atividade de MPO nos animais TNFp55KO estava significativamente reduzida aos 15 (P<0.05 vs WT) e 60 dias (P<0.05 vs WT) pi (Fig.23). Também investigamos o papel de TNFp55 na modulação da produção de anticorpos específicos para *A. actinomycetemcomitans* durante o curso da DP experimental (Fig. 23). Nossos resultados demonstram que os títulos de IgG total nos animais TNFp55-KO são similares àqueles vistos nos animais WT aos 15, 30 e 60 dias após a inoculação inicial dos microrganismos (Fig.23).

4.21. Papel do IFN-γ e IL-12 na modulação da reação inflamatória e perda óssea alveolar induzida por *A. actinomycetemcomitans*

Nosso próximo passo foi analisar a modulação da reação inflamatória e da reabsorção óssea alveolar em camundongos IFN-γKO e IL-12KO infectados com *A*.



Figura 23 - Produção de mediadores antimicrobianos durante o curso da doença periodontal experimental induzida por *A. actinomycetemcomitans* **em camundongos TNFp55-KO.** Camundongos TNFp55-KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A. actinomycetemcomitans* foram analisados quanto a da expressão de mRNA para iNOS (média ± SD, da intensidade de expressão de mRNA, normalizado pela beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo), níveis de MPO nos tecidos periodontais (média ± SD da DO referente a atividade de MPO nos tecidos periodontais por animal, normalizados pelo peso do tecido, pool de 5 animais em cada tempo). Amostras de soro foram utilizadas para a detecção de anticorpos específicos para *A. actinomycetemcomitans* por ELISA (média ± SD, dos títulos de anticorpos específicos para *A. actinomycetemcomitans* por ELISA (média ± SD, dos títulos de anticorpos específicos para *A. actinomycetemcomitans* por ELISA (média ± SD, dos títulos de 3 experimentos independentes.*p<0.05 vs WT.

actinomycetemcomitans (Fig.24). Nossos resultados demonstram uma significativa redução no número de leucócitos presentes nos tecidos periodontais dos animais IFN- γ KO aos 7 (P<0.05 vs WT), 15 (P<0.001 vs WT), e 30 dias (P<0.001 vs WT) pós-infecção, quando comparados aos animais WT. Com relação aos animais IL-12KO, o número de células inflamatórias extraídas dos tecidos periodontais apresentava uma pequena diminuição, quando comparados aos animais WT, apesar da ausência de significância estatística (Fig.24). A análise histológica dos tecidos periodontais dos animais IFN- γ KO demonstra uma menor quantidade de células inflamatórias, enquanto o infiltrado inflamatório nos tecidos periodontais dos animais IL-12KO é similar ao visto nos animais WT (Fig. 25).

Com relação à reabsorção óssea, constatamos um menor aumento na área entre a junção amelo-cementária (JAC) e a crista óssea alveolar (COA) nos animais IFN-γKO nos aos 30 (P<0.05 vs WT) e 45 dias pi (P<0.01 vs WT), quando comparados aos animais WT. Assim como visto com relação a resposta inflamatória, os animais IL-12KO apresentaram apenas uma redução não significativa na reabsorção óssea durante o curso da DP experimental quando comparados aos animais WT (Fig.24). Apenas no tempo de 45 dias foi constatada uma redução significativa (P<0.05 vs WT) na área JAC-COA nos animais IL-12KO comparados aos camundongos WT (Fig.24).

4.22. Papel de IFN-γ e IL-12 na modulação da migração celular para os tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*

Analisamos também o fenótipo das leucócitos presentes no tecido periodontal de camundongos IFN-γKO e IL12KO submetidos ao protocolo de indução de DP (Fig. 26). Nossos resultados demonstram que o número de neutrófilos (células GR1+) nos tecidos periodontais era significativamente menor nos animais IFN-γKO aos 7 (P<0.05 vs WT), 15



Figura 24 – Reação inflamatória e perda óssea alveolar induzida por *A. actinomycetemcomitans* **em animais IFN-γKO e IL-12KO.** Camundongos IFN-γKO, IL-12KO e C57BL/6 (WT) submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans (AA),* grupos controle de animais não infectados e sham-infectados foram analisados quanto a cinética de desenvolvimento de reação inflamatória nos tecidos periodontais e perda óssea alveolar. A) Número de leucócitos extraídos através de digestão enzimática do tecido periodontal, corados com azul de tripam e contados em câmara de Neubauer. B) Aumento da área JAC-COA na face palatina dos molares, em relação aos animais controle, medida em unidades arbitrárias de área (UAA) com o programa ImageTool 2.0. Os resultados apresentados representam os valores da média ± SD, da área JAC-COA (obtidos de 3 animais) ou número de células por animal (obtidos de 5 animais) em cada tempo, representativos de três experimentos independentes. *P<0.05 vs WT.



Figura 25 - Análise histopatológica dos tecidos periodontais de camundongos IFN-γKO e IL-12KO **infectados com** *A. actinomycetemcomitans*. Camundongos IFN-γKO e IL-12KO submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans* foram sacrificados após 0h (**A**: IFN-γKO; **B**: IL-12KO), e 60 (**C**: IFN-γKO; **D**: IL-12KO) dias de infecção. Amostras de tecido periodontal foram coletadas, fixadas em paraformaldeído, desmineralizadas com ácido tricloroacético e inclusas em blocos de parafina. Cortes de 5 μm de espessura foram obtidos com auxílio de um micrótomo, corados com hematoxilina e eosina, e submetidos a análise histopatológica. Aumento original 40X. Resultados obtidos de dois animais de cada grupo experimental, representativos de 3 experimentos independentes.



Figura 26 - Análise fenotípica dos leucócitos extraídos dos tecidos periodontais de camundongos IFNγ**KO e IL-12KO infectados com** *A. actinomycetemcomitans.* **Amostras de tecido periodontal palatino de camundongos IFN-γKO, IL-12KO e C57BL/6 (WT) submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com** *A.actinomycetemcomitans* **foram coletadas, submetidas a digestão enzimática, e a contagem de células realizada em câmara de neubauer. Para as análises de citometria de fluxo, 1x10⁶ cel/ml células foram incubadas com anticorpos conjugados a PE ou FITC, específicos para os seguintes marcadores: CD3, CD4, CD8, GR1 e F4/80, e a análise realizada em FACScan utilizando-se parâmetros de tamanho (FSC), granularidade (SSC), e fluorescência (FL1 e FL2). O número absoluto das células GR1+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, F4/80+ e CD19+ foi calculado proporcionalmente em relação ao número de células totais. Os resultados representam os valores da média ± SD, do número de células por animal, provenientes de dois experimentos independentes. *p<0.05 vs WT; # : não avaliado.**

(P<0.05 vs WT) e 30 (P<0.05 vs WT) dias pós-infecção (Fig. 26). O mesmo foi verificado com relação ao número de macrófagos (células F4/80+), as quais foram encontradas em número significativamente menor aos tempos de 7 (P<0.01 vs WT), 15 (P<0.001 vs WT), e 30 (P<0.001 vs WT) dias pi. Ao analisarmos o número de linfócitos T CD4 e CD8 nos tecidos periodontais dos animais IFN-yKO, constatamos que tais células se encontram em quantidade significativamente menor quando comparados aos animais WT, nos tempos de 7 (P<0.01 vs WT), 15 (P<0.001 vs WT), e 30 (P<0.001 vs WT) dias após a inoculação dos microrganismos (Fig.26). Com relação aos linfócitos B (células CD19+), verificamos um número similar de tais células nos tecidos periodontais dos camundongos IFN-yKO e WT durante todo o curso da doença (Fig.26). De forma similar, nossos resultados não demonstram diferenças significativas entre o número de neutrófilos, macrófagos, linfócitos CD4 e CD8 presentes nos tecidos periodontais dos animais IL-12KO e WT, em nenhum dos tempos analisados. Também constatamos que linfócitos B estão presentes nos tecidos periodontais de camundongos IL-12KO e WT em números similares durante todo o curso da doença, exceção feita ao tempo de 60 dias após a infecção, no qual se verifica uma redução significativa no número de linfócitos B nos animais IL-12KO (Fig. 26).

4.23. Papel de IFN-γ e IL-12 na modulação da expressão de citocinas nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*

Uma vez que IFN- γ e IL-12 estão potencialmente envolvidas na modulação da resposta imune e inflamatória no microambiente periodontal, analisamos em seguida a expressão de citocinas nos tecidos periodontais de animais IFN- γ KO e IL-12KO infectados com *A. actinomycetemcomitans* (Fig. 27). Verificamos que nos animais IFN- γ KO, a expressão de TNF- α e IL-1 β se mostrava significativamente reduzida aos tempos 1 (p<0.001: IL-1 β vs



Figura 27 – Cinética de expressão de citocinas nos tecidos periodontais de camundongos IFN- γ KO e IL-12KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos IFN- γ KO, IL-12KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans,* foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de IL-1 β , TNF- α , IL-4 e IL-10 foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média ± SD, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. *p<0.05 WT; # : não avaliado.

WT, p<0.05: TNF vs WT), 7 (P<0.001) e 15 (P<0.001) dias pi. Aos tempos de 30 e 60 dias, apesar de uma pequena redução na expressão de TNF- α e IL-1 β nos tecidos periodontais dos animais IFN-yKO, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas (Fig.27). Por outro lado, nos animais geneticamente deficientes de IL-12, verificamos que a expressão de IL-1 β (P<0.05 vs WT) e TNF- α (P<0.05 vs WT) estava significativamente reduzida 1 e 7 dias após a inoculação das bactérias, enquanto que nos demais tempos analisados tal expressão era similar aquela apresentada pelos animais WT infectados (Fig.27). Nossos dados também demonstram que os animais IL-12KO apresentavam uma redução significativa na expressão de IFN- γ nos tempos de 1 (P<0.05 vs WT) e 7 dias (P<0.05 vs WT) pós infecção, enquanto nos tempos de 15, 30 e 60 dias tal expressão é similar aquela vista nos animais WT (Fig.30). Além disso, também detectamos a expressão das citocinas IL-18 e IL-23 nos tecidos periodontais dos animais infectados com A. actinomycetemcomitans, sendo tal expressão similar nos camundongos WT, IFN-γKO e IL-12KO (Fig. 30). Ao analisarmos a expressão de IL-10, constatamos um aumento significativo na intensidade de expressão de tal citocina nos tecidos peridontais dos animais IFN-yKO nos tempos de 7 (P<0.05 vs WT), 15 (P<0.05 vs WT) e 30 (P<0.05 vs WT) dias após a inoculação inicial dos microrganismos (Fig.27). Ao contrário, a expressão de IL-10 nos tecidos periodontais dos camundongos WT e IL-12 foi similar em todos os tempos analisados. Com relação à expressão de IL-4, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens de camundongos WT, IFN-yKO e IL-12KO infectados com A. actinomycetemcomitans (Fig.27). A expressão do gene constitutivo beta-actina foi verificada em todos os tempos analisados (dados não mostrados), sendo utilizada como controle positivo da reação e para normalização dos níveis de expressão de mRNA. Também analisamos a produção de IL-1 β , TNF- α , IL-4 e IL-10 nos tecidos periodontais dos animais IFN-yKO e IL-12KO durante o curso da DP experimental, através de ELISA (Fig.28). Nossos resultados confirmam aqueles relativos a expressão de mRNA para tais citocinas, demonstrando uma redução significativa nos níveis de IL-1 β e TNF- α nos tecidos periodontais dos camundongos IFN- γ KO aos 15 dias após a inoculação dos microrganismos (P<0.05 vs WT), enquanto um aumento nos níveis de IL-10 foi verificado 15 dias após a infecção (P<0.05 vs WT). Nossos resultados não demonstram alterações significativas nos níveis de IL-4 nos tecidos periodontais dos animais IL-12KO durante o curso da infecção (Fig.28).

4.24. Papel de IFN-γ e IL-12 na modulação da expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A*. *actinomycetemcomitans*

Na seqüência, analisamos o papel de IFN- γ e IL-12 na modulação da expressão de quimiocinas e seus receptores nos tecidos periodontais durante o curso da DP experimental (Fig. 29 e 30). Ao analisarmos a expressão de CXCL3, não foram encontradas diferenças entre os animais WT, IFN- γ KO e IL-12 em nenhum dos tempos analisados. Ao contrário, verificamos que nos animais IFN- γ KO a expressão de CXCL1 e CCL5, assim como seus respectivos receptores CXCR2 e CCR5, estava significativamente reduzida nos tempos de 1 (P<0.05 vs WT), 7 (P<0.05 vs WT), 15 (P<0.05 vs WT) e 30 (P<0.05 vs WT) dias após a infecção, quando comparados aos animais WT (Fig. 29 e 30). Também constatamos uma menor expressão de CCL3 nos tecidos periodontais dos animais IFN- γ KO, nos tempos de 1 (P<0.05 vs WT), 7 (P<0.05 vs WT) 15 (P<0.05 vs WT) e 30 (P<0.05 vs WT) dias após a inoculação dos microganismos. A expressão de CXCL10 não foi detectada nos animais IFN- γ KO em nenhum dos tempos analisados (Fig.30). Entretanto, o receptor de CXCL10, CXCR3 foi detectado nos tecidos periodontais dos animais IFN- γ KO durante todo o curso da doença, porém em níveis significativamente menores que nos animais WT; 24h (P<0.001 vs WT), 7 (P<0.001 vs WT) e 30 (p<0.001 vs WT) (Fig.30).



Figura 28 - Níveis de citocinas nos tecidos periodontais de camundongos IFN- γ KO e IL-12KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal palatino de camundongos IFN- γ KO, IL-12KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal foram coletadas, pesadas e homogenizadas, sendo o sobrenadante analisado quanto aos níveis de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10 por ELISA. Os resultados são expressos como pg de citocina por mg de tecido por animal, e representam os valores (média + SD), provenientes de 2 animais por grupo em cada tempo, representativos de 3 experimentos independentes. *p<0.05 vs WT; # : não avaliado.



Figura 29- Cinética de expressão de IFN- γ , IL-18 e IL-23 nos tecidos periodontais de camundongos IFN- γ KO e IL-12KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos IFN- γ KO, IL-12KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans* foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de IFN- γ , IL-18 e IL-23 foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média \pm SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. *p<0.05 vs WT; # : não avaliado.



Figura 30 - Cinética de expressão de quimiocinas nos tecidos periodontais de camundongos IFN- γ KO e IL-12KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos IFN- γ KO, IL-12KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans* foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de CXCL3, CXCL1, CCL3, CCL5, CXCL10 e CCL1 foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média ± SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. *p<0.05 vs WT; # : não avaliado. Também constatamos que a expressão de CCL1 era similar nos animais WT e IFN- γ KO aos 15 dias de infecção, contudo, tal expressão era significativamente mais intensa nos animais IFN- γ KO no tempo de 30 dias pi (P<0.05 vs WT) (Fig.30). A expressão de CCR4 se mostrou mais intensa nos camundongos IFN- γ KO aos tempos de 7 e 15 (P<0.01 vs WT) dias após a inoculação dos microrganismos, enquanto que nos demais tempos não foram encontradas diferenças significativas (Fig. 30). Ao contrário do verificado nos animais IFN- γ KO, a expressão de quimiocinas (CXCL3, CXCL1, CCL-3, CCL5, CXCL-10, CCL-1) e receptores de quimiocinas (CXCR2, CXCR3, CCR5 e CCR4) nos animais IL-12KO infectados com *A. actinomycetemcomitans* foi similar aquela vista nos animais WT em todos os tempos analisados (Fig. 30 e 31). A expressão do gene constitutivo beta-actina foi verificada em todos os tempos analisados (dados não mostrados), sendo utilizada como controle positivo da reação e para normalização dos níveis de expressão de mRNA.

4.25. Papel de IFN-γ e IL-12 na modulação da expressão de metaloproteases (MMPs), RANKL e seus respectivos inibidores (TIMPs e OPG) nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*

Investigando os mecanismos envolvidos na destruição tecidual possivelmente modulados por IFN- γ e IL-12, nosso próximo passo foi a analise da expressão de MMPs, RANKL e e seus respectivos inibidores nos tecidos periodontais de animais infectados com *A. actinomycetemcomitans* (Fig. 32 e 33). Constatamos que a expressão de MMPs (MMP-1, MMP-2 e MMP-9) se mostrou significativamente reduzida nos animais IFN- γ KO quando comparados aos animais WT, em todos os tempos analisados [MMP-1: 24h (P<0.05 vs WT), 7d(P<0.05 vs WT), 15d(P<0.05 vs WT), 30d(P<0.05 vs WT); MMP-2: 24h (P<0.05 vs WT), 7d(P<0.05 vs WT), 15d(P<0.05 vs WT), 30d(P<0.05 vs WT); MMP-9: 24h (P<0.05 vs WT),



Figura 31 - Cinética de expressão de receptores de quimiocinas nos tecidos periodontais de camundongos IFN- γ KO e IL-12KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos IFN- γ KO, IL-12KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans*, foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de CXCR2, CXCR3, CCR5 e CCR4 foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média \pm SD, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. *p<0.05 vs WT; # : não avaliado.



Figura 32 - Cinética de expressão de metaloproteases (MMPs) e inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) nos tecidos periodontais de camundongos IFN- γ KO e IL-12KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos IFN- γ KO, IL-12KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans* foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média \pm SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. *p<0.05 vs WT; # : não avaliado.



Figura 33 - Cinética de expressão de RANKL, OPG e catepsina K nos tecidos periodontais de camundongos IFN- γ KO e IL-12KO infectados com A. actinomycetemcomitans. Amostras de tecido periodontal de camundongos IFN- γ KO, IL-12KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com A.actinomycetemcomitans foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de RANKL, OPG e catepsina K foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média \pm SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. *p<0.05 vs WT; # : não avaliado.

7d(P<0.05 vs WT), 15d(P<0.05 vs WT), 30d(P<0.05 vs WT)] (Fig.33). Ao analisarmos os níveis de expressão de RANKL nos tecidos periodontais dos camundongos IFN-γKO infectados com *A. actinomycetemcomitans*, constatamos uma redução significativa na expressão de tal fator aos 7 (P<0.001 vs WT) e 15 (P<0.001 vs WT) dias pi (Fig.33). De forma similar, a expressão de catepsina K nos camundongos IFN-γKO estava significativamente reduzida aos aos 7 (P<0.001 vs WT), 15 (P<0.001 vs WT) e 30 (P<0.001 vs WT) dias pi (Fig.33).

Ao contrário, a expressão de TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e OPG estava significativamente aumentada nos animais IFN-KO nos tempos de 7 (TIMP-1 P<0.05 vs WT; TIMP-2 P<0.05 vs WT; TIMP-9 P<0.05 vs WT; OPG P<0.05 vs WT) e 15 dias pi (TIMP-1 P<0.05 vs WT; TIMP-2 P<0.05 vs WT; TIMP-9 P<0.05 vs WT; OPG P<0.05 vs WT), enquanto que nos demais tempos não foram verificadas diferenças significativas entre os níveis de expressão de TIMPs e OPG entre os animais IFN-γKO e WT (Fig. 32 e 33). Nos camundongos IL-12KO não foram verificadas diferenças nos níveis de expressão de MMP-1, MMP-2, MMP-9, RANKL, catepsina K, TIMPs e OPG nos tecidos periodontais comparados aos WT (Fig. 32 e 33). A expressão do gene constitutivo beta-actina foi verificada em todos os tempos analisados (dados não mostrados), sendo utilizada como controle positivo da reação e para normalização dos níveis de expressão de mRNA.

4.26. Papel do IFN- γ e IL-12 na modulação da infecção experimental por *A*. *actinomycetemcomitans*

Tendo em vista o destacado papel de respostas do tipo Th1 no controle de diversos processos infecciosos, analisamos em seguida o papel de IFN- γ e IL-12 no controle da infecção experimental por *A.actinomycetemcomitans* (Fig. 34). Nossos resultados demonstram



Figura 34 – Infecção de camundongos IFN-γKO e IL-12KO por *A. actinomycetemcomitans:* mortalidade, disseminação da infecção e quantificação da carga bacteriana nos tecidos peridontais. Camundongos IFN-γKO, IL-12KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A. actinomycetemcomitans (AA)* ou *Porphyromonas gingivalis (PG)* foram analisados quanto a sobrevivência durante o curso da DP experimental, presença de *A. actinomycetemcomitans* em diferentes órgãos (detecção de DNA bacteriano por PCR), assim como quanto a carga bacteriana nos tecidos periodontais (quantificação do DNA bacteriano por RealTimePCR). Resultados representativos de 3 experimentos independentes. *p<0.05 vs WT; # : não avaliado.

que apesar da reduzida severidade da DP apresentada pelos animais IFN γ -KO, tal linhagem apresenta 100% mortalidade a infecção experimental por *A. actinomycetemcomitans* no período entre 42 e 55 dias de infecção. Ao contrário, nas demais linhagens de camundongos geneticamente deficientes utilizadas neste estudo, TNF-p55KO e IL-12KO, não foram verificadas mortes no período analisado (até 60 dias após a inoculação inicial dos microrganismos). Ao contrário, a infecção dos animais IFN- γ KO com o periodontopatógeno *P. gingivalis* não resultou em mortalidade dos animais durante o curso da doença (Fig.34).

Investigando o motivo da morte dos animais IFNy-KO frente a infecção por A. actinomycetemcomitans, realizamos reações de PCR para a detecção de tal patógeno em diferentes órgãos no dia 50 pós-infecção. Detectamos reações positivas para a detecção de A. actinomycetemcomitans nos tecidos periodontais, estômago, intestino, pulmão, fígado, coração, rim e baço dos animais IFNy-KO, sendo que a presença de A. actinomycetemcomitans não foi detectada no cérebro destes animais. Ao contrário, nos animais WT e IL-12KO (Fig. 34), e TNFp55KO (dados não mostrados) a presença de A. actinomycetemcomitans foi detectada apenas nos tecidos periodontais, estômago e intestino. Resultados negativos para a detecção de A. actinomycetemcomitans foram verificados em todos os órgãos dos animais controle (dados não mostrados). A análise histopatológica dos órgãos dos animais IFN-γKO coletados 50 após а inoculação oral de Α. actinomycetemcomitans demonstrou a presenca de um intenso infiltrado inflamatório no pulmão, ao contrário dos animais WT (Fig. 35), IL-12KO e TNFp55-KO (dados não mostrados), nos quais o pulmão se mostrava normal. Com relação a análise histopatológica dos demais órgãos analisados (coração, fígado, rim, estômago e intestino) não foram visualizadas alterações em nenhuma das linhagens de animais (IFN-yKO, IL-12KO, TNFp55-KO, WT) submetidas a infecção por A. actinomycetemcomitans (dados não mostrados).



Figura 35 - Análise histopatológica dos pulmões de camundongos IFN-γKO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Camundongos IFN-γKO e C57BL/6 (WT) submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A. actinomycetemcomitans* foram sacrificados após 45 (**A** e **B**- IFN-γKO infectados), 45 (**C** - IFN-γKO, não infectado) e 60 (**D** – WT, infectado) dias de infecção, amostras de pulmão foram coletadas, fixadas em paraformaldeído, inclusos em blocos de parafina. Cortes de 5 μm de espessura foram obtidos com auxílio de um micrótomo, corados com hematoxilina e eosina, e submetidos a análise histopatológica. Aumento original 40X.

Além disso, verificamos que a carga bacteriana nos tecidos periodontais dos animais IFN- γ KO, era significativamente maior do que aquela vista nos animais WT infectados com *A. actinomycetemcomitans* (7d p<0.001 vs WT; 15d p<0.001 vs WT; 30d p<0.001 vs WT) (Fig. 34). A infecção dos animais IFN γ -KO com *P. gingivalis* também resultou em uma carga bacteriana significativamente maior nos tecidos periodontais em todos os tempos analisados (7d p<0.001 vs WT; 30d p<0.001 vs WT; 60d p<0.001 vs WT)(Fig. 34). Ao analisarmos quantitativamente a presença de *A. actinomycetemcomitans* nos tecidos periodontais dos camundongos IL-12KO, verificamos que apesar de um aumento significativo no tempo de 7 dias (p<0.01 vs WT), nos demais pontos analisados não foram encontradas diferenças entre os animais WT e IL-12KO (Fig.34). Reações negativas para a detecção de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* foram verificadas nos tecidos periodontais dos animais controle de todos os grupos e linhagens de camundongos (dados não mostrados).

4.27. Papel de IFN-γ e IL-12 na modulação dos efeitos sistêmicos da infecção por A. actinomycetemcomitans

Tendo em vista a maior suscetibilidade de camundongos IFN- γ KO a infecção por *A*. *actinomycetemcomitans*, tais animais foram analisados com relação a resposta de fase aguda, assim como quanto ao ganho de peso durante o curso da doença (Fig. 36). Nossos resultados demonstraram que a infecção por *A. actinomycetemcomitans* nos animais IFN γ -KO resultava em uma maior expressão de mRNA para proteína C reativa no figado dos animais aos 7 (p<0.01 vs WT), 15 (p<0.01 vs WT) e 30 (p<0.01 vs WT) dias após a inoculação dos microrganismos. Também verificamos que os níveis de proteína C reativa no soro dos animais IFN- γ KO infectados com *A. actinomycetemcomitans* eram significantativamente maiores que aqueles detectados nos animais WT, nos tempos de 15 (p<0.01 vs WT) e 30 (p<0.01 vs WT)


Figura 36 - Resposta sistêmica à infecção experimental por *A. actinomycetemcomitans* em camundongos IFN- γ KO e IL-12KO. Amostras de tecido periodontal de camundongos IFN- γ KO, IL-12KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans* (AA) ou *P. gingivalis (PG),* foram analisados quanto a carga bacteriana nos tecidos periodontias (média ± SD níveis de expressão de DNA bacteriano por RealTimePCR); resposta de fase aguda (média ± SD níveis de expressão de mRNA de CRP no fígado; média ± SD dos níveis de CRP em µg/ml soro), assim como quanto ao ganho de peso durante o curso da doença (média ± SD do peso de 3 camundongos em cada tempo analisado). Resultados representativos de 3 experimentos independentes. *p<0.05 vs WT; # : não avaliado.

dias pi (Fig.36). De forma similar, a infecção dos animais IFN- γ KO com *P. gingivalis* resulta em maiores níveis de proteína C reativa no soro dos animais infectados quando comparados aos animais WT em todos os tempos analisados (15 dias: p<0.01 vs WT, 30 dias: p<0.01 vs WT, 45 dias: p<0.01 vs WT) (Fig.36). Com relação aos animais IL-12KO, nossos resultados demostram que a expressão de CRP no figado, assim como os níveis de CRP no soro se encontrava em níveis similares aqueles apresentados pelos animais WT (Fig.36).

Ao analisarmos o ganho de peso dos camundongos durante o curso da infecção, constatamos que os animais IFNγ-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans* apresentavam uma redução do ganho de peso aos 30 (p<0.01 vs controle) e 45 (p<0.01 vs controle) dias após a infecção, quando comparados aos animais não infectados (Fig. 36). Nossos resultados também demonstram que tal redução no ganho de peso também foi verificada quando os animais IFN-γKO são infectados com *P. gingivalis*, sendo o ganho de peso estatisticamente menor aos 45 (p<0.01 vs controle) e 60 (p<0.01 vs controle) dias de infecção (Fig.36). Os animais IL-12KO infectados com *A. actinomycetemcomitans* não apresentaram redução no ganho de peso quando comparados aos camundongos não infectados (Fig.36).

4.28. Papel de IFN-γ e IL-12 na modulação de fatores antimicrobianos durante o curso da doença periodontal experimental induzida por *A. actinomycetemcomitans*

Tendo em vista a maior suscetibilidade de camundongos IFN- γ KO a infecção por *A*. *actinomycetemcomitans*, tais animais foram analisados quanto à expressão de iNOS, atividade de MPO, assim como quanto a produção de anticorpos durante o curso da doença (Fig.37). Verificamos que a expressão de iNOS nos tecidos periodontais estava significativamente reduzida nos animais IFN- γ KO em todos os tempos analisados (24h p<0.001 vs WT, 7d p<0.001 vs WT, 15d p<0.001 vs WT, 30d p<0.001 vs WT), quando comparados aos animais



Figura 37 - Produção de mediadores antimicrobianos durante o curso da doença periodontal experimental induzida por *A. actinomycetemcomitans* em camundongos IFN-γKO e IL-12KO. Camundongos IFN-γKO, IL-12KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A. actinomycetemcomitans* foram analisados quanto à expressão de mRNA para iNOS (média ± SD, da intensidade de expressão de mRNA, normalizado pela beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo), níveis de MPO nos tecidos periodontais (média ± SD da DO referente à atividade de MPO nos tecidos periodontais por animal, normalizados pelo peso do tecido, pool de 5 animais em cada tempo). Amostras de soro foram utilizadas para a detecção de anticorpos específicos para *A. actinomycetemcomitans* por ELISA (média ± SD, dos títulos de anticorpos específicos para *A. actinomycetemcomitans* por ELISA (média ± SD, dos títulos de anticorpos específicos para *A. actinomycetemcomitans* por ELISA (média ± SD, dos títulos de 3 experimentos independentes.*p<0.05 vs WT; # : não avaliado.

WT (Fig.37). Com relação aos animais IL-12KO, nossos resultados demonstram que a expressão de iNOS foi detectada em níveis similares nos tecidos periodontais dos animais WT e IL12-KO. Ao compararmos os níveis de atividade de MPO nos animais IFN- γ KO, IL-12KO e WT, contatamos uma significativa redução em tais níveis nos animais IFN- γ KO aos 15 (P<0.001 vs WT) dias pós infecção, quando comparados aos animais WT (Fig. 37). Por outro, nos animais IL-12KO, a atividade de MPO se mostrou similar àquela verificada nos tecidos periodontais dos WT em todos os tempos analisados. Finalmente, investigamos também o papel de IFN- γ e IL-12 na modulação da produção de anticorpos específicos para *A. actinomycetemcomitans* durantes o curso da DP experimental. Nossos resultados demonstraram que os títulos de IgG total nos animais IFN- γ KO e IL-12KO são similares aqueles vistos nos animais WT em todos os tempos analisados. (Fig. 37).

4.29. Papel de iNOS no controle da infecção experimental por A. actinomycetemcomitans

Uma vez que a expressão de iNOS se mostrava reduzidas nos animais IFN- γ KO, nosso próximo passo foi analisar o controle da infecção por *A.actinomycetemcomitans* em camundongos iNOS-KO (Fig.38). Nossos resultados demonstram que os animais iNOS-KO apresentaram um aumento significativo na carga bacteriana nos tecidos peridontais aos 7 (p<0.001 vs WT), 30 (p<0.001 vs WT) e 60 (p<0.001 vs WT) dias pós-infecção, quando comparados aos animais WT infectados. Também constatamos que os níveis de CRP no soro dos animais iNOS-KO era significativamente maior que nos animais WT em todos os tempos analisados (p<0.05 vs WT) (Fig.38). Com relação ao ganho de peso dos animais iNOS-KO durante o curso da PD, nossos resultados demonstram uma redução no ganho de peso nos animais infectados com *A. actinomycetemcomitans*, quando comparados aos não infectados, aos 45 (p<0.05 vs WT) e 60 (p<0.05 vs WT) dias após a inoculação oral dos microganismos.



Figura 38 - Quantificação da carga bacteriana nos tecidos periodontais e resposta sistêmica à infecção de camundongos iNOS-KO por *A. actinomycetemcomitans.* Camundongos iNOS-KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A. actinomycetemcomitans* (AA) foram analisados quanto a carga bacteriana nos tecidos periodontias (média \pm SD níveis de expressão de DNA bacteriano por RealTimePCR); resposta de fase aguda (média \pm SD níveis de expressão de mRNA de CRP no fígado; média \pm SD dos níveis de CRP em µg/ml soro), assim como quanto a mortalidade e ao ganho de peso durante o curso da doença (média \pm SD do peso de 3 camundongos em cada tempo analisado). Resultados representativos de 3 experimentos independentes. *p<0.05 vs WT.

Entretanto, não foram verificadas mortes durante o curso da infecção experimental por *A*. *actinomycetemcomitans* nos animais iNOS-KO (Fig. 38). Aos 60 dias de infecção, a detecção de *A. actinomycetemcomitans* por PCR se mostrou restrita aos tecidos periodontais, estômago e intestino dos animais iNOS-KO, assim como nos animais WT (dados não mostrados).

4.30. Papel de IL-4 e IL-10 na modulação da reação inflamatória e perda óssea alveolar induzida por *A. actinomycetemcomitans*

Tendo em vista as evidências da participação de IL-4 e IL-10 na regulação da severidade da DP, nosso próximo passo foi analisar o papel de tais citocinas na modulação da resposta inflamatória e a reabsorção óssea alveolar (Fig. 39). A análise quantitativa dos leucócitos extraídos do tecido gengival dos animais IL-4-KO mostrou números similares aos vistos nos animais WT aos tempos de 1, 7 e 15 dias após a infecção, enquanto um grande aumento foi verificado nos tempos de 30 (p<0.001 vs WT) e 60 (p<0.001 vs WT) dias pi. Com relação aos animais IL-10KO, verificamos um aumento significativo no número de leucócitos extraídos dos tecidos periodontais aos 15 (p<0.05 vs WT), 30 (p<0.001 vs WT) e 60 (p<0.001 vs WT) dias de infecção, quando comparados aos animais IL-4KO e IL-10KO, apenas no tempo de 30 dias foi verificada uma diferença significativa, sendo o número de células maior nos animais IL-4KO. A análise histológica dos tecidos periodontais dos animais IL-4KO e IL-10KO demonstra claramente uma maior quantidade de células inflamatórias, principalmente nas regiões adjacentes ao epitélio juncional e no tecido conjuntivo próximo a crista óssea alveolar (Fig. 40).

Com relação a reabsorção óssea, os animais IL-4KO e IL-10KO apresentam um significativo aumento da área entre a junção amelo-cementária (JAC) e a crista óssea alveolar (COA) aos 30 (IL-4: p<0.05 vs WT; IL-10: ns), 45 (p<0.001 vs WT) e 60 (p<0.001 vs WT)

dias de infecção, quando comparados aos animais WT. Comparando as duas linhagens KOs, constatamos que os animais IL-4KO apresentam uma reabsorção óssea significativamente maior que os camundongos IL-10KO no tempo de 60 dias pi (p<0.001) (Fig. 39).



Figura 39 – Reação inflamatória e perda óssea alveolar induzida por A. actinomycetemcomitans em animais IL-4KO e IL-10KO. Camundongos IL-4KO, IL-10KO e C57BL/6 (WT) submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com A.actinomycetemcomitans (AA), grupos controle de animais não infectados e sham-infectados, foram analisados quanto a cinética de desenvolvimento de reação inflamatória nos tecidos periodontais e perda óssea alveolar. A) Número de leucócitos extraídos através de digestão enzimática do tecido periodontal, corados com azul de tripam e contados em câmara de Neubauer. B) Aumento da área JAC-COA, em relação aos animais controle, na face palatina dos molares, medida em unidades arbitrárias de área (UAA) com o programa ImageTool 2.0. Os resultados apresentados representam os valores da média ± SD, da área JAC-COA (obtidos de 3 animais) ou número de células por animal (obtidos de 5 animais) em cada tempo, representativos de três experimentos independentes. *P<0.05 vs WT; **P<0.05 vs IL-10KO.



Figura 40 - Análise histopatológica dos tecidos periodontais de camundongos IL-4KO e IL-10KO infectados com *A. actinomycetemcomitans.* Camundongos IL-4KO e IL-10KO submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans* foram sacrificados após 0h (**A**: IL-4KO; **B**: IL-10KO), e 60 (**C**: IL-4KO; **D**: IL-10KO) dias de infecção. Amostras de tecido periodontal foram coletadas, fixadas em paraformaldeído, desmineralizadas com ácido tricloroacético e inclusas em blocos de parafina. Cortes de 5μm de espessura foram obtidos com auxílio de um micrótomo, corados com hematoxilina e eosina, e submetidos a análise histopatológica. Aumento original 40X. Resultados obtidos de dois animais de cada grupo experimental, representativos de 3 experimentos independentes.

4.31. Papel de IL-4 e IL-10 na modulação da migração celular para os tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*

Após verificarmos um aumento no número absoluto de leucócitos nos tecidos periodontais dos animais IL-4KO e IL-10KO infectados com A. actinomycetemcomitans, analisamos também o fenótipo das células constituintes do infiltrado celular inflamatório nos tecidos periodontais dos animais (Fig. 41). Ao analisarmos o número de neutrófilos (células GR1+) não foram encontradas diferenças entre o número de tais células entre os animais IL-4KO, IL-10KO e WT infectados com A. actinomycetemcomitans em nenhum dos tempos analisados. Ao contrário, nossos resultados demonstraram um aumento significativo no número de macrófagos (células F4/80+) nos tecidos periodontais dos animais IL-4KO e IL-10KO aos 15 (P<0.05 vs WT), 30 (P<0.05 vs WT) e 60 (P<0.05 vs WT) dias após a inoculação dos microrganismos, quando comparados aos animais WT (Fig. 41). Também verificamos um aumento significativo no número de linfócitos T CD4 nos animais IL-4KO, nos tempos de 30 (P<0.05 vs WT) e 60 dias (P<0.05 vs WT), assim como nos animais IL-10KO, aos 15 (P<0.05 vs WT), 30 (P<0.05 vs WT) e 60 (P<0.05 vs WT) dias pi. Linfócitos T CD8 também foram encontrados em maiores números nos tecidos periodontais dos animais IL-4KO e IL-10KO nos tempos de 30 (P<0.05 vs WT) e 60 (P<0.05 vs WT) dias de infecção, quando comparados aos animais WT. Ao analisarmos o número de linfócitos B (células CD19+) nos tecidos periodontais dos animais IL-4KO, IL-10KO e WT infectados com A. actinomycetemcomitans, não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos tempos analisados (Fig. 41).

4.32. Papel de IL-4 e IL-10 na modulação da expressão de citocinas nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*



Figura 41 - Análise fenotípica dos leucócitos extraídos dos tecidos periodontais de camundongos IL-4KO e IL-10KO infectados com *A. actinomycetemcomitans.* **Amostras de tecido periodontal palatino de camundongos IL-4KO, IL-10KO e C57BL/6 (WT) submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com** *A.actinomycetemcomitans* **foram coletadas, submetidas à digestão enzimática, e a contagem de células realizada em câmara de neubauer. Para as análises de citometria de fluxo, 1x10⁶ cel/ml células foram incubadas com anticorpos conjugados a PE ou FITC, específicos para os seguintes marcadores: CD3, CD4, CD8, GR1 e F4/80, e a análise realizada em FACScan utilizando-se parâmetros de tamanho (FSC), granularidade (SSC), e fluorescência (FL1 e FL2). O número absoluto das células GR1+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, F4/80+ e CD19+ foi calculado proporcionalmente em relação ao número de células totais. Os resultados representam os valores da média ± SD do número de células por animal, provenientes de dois experimentos independentes. *p<0.001 vs WT.**

Buscando esclarecer os mecanismos envolvidos na modulação da severidade da DP pelas citocinas Th2, IL-4 e IL-10, nosso próximo passo foi investigar a expressão de citocinas nos tecidos periodontais dos animais geneticamente deficientes de IL-4 e IL-10 (Fig 42). Nossos resultados demonstraram que os níveis de expressão de TNF- α e IL-1 β eram significativamente maiores nos animais IL-4KO quando comparados aos animais WT infectados, aos 7 (P<0.05 vs WT), 30 (P<0.05 vs WT) e 60 (P<0.05 vs WT) dias após a infecção com *A. actinomycetemcomitans*. Analisando a expressão de TNF- α e IL-1 β nos animais geneticamente deficientes de IL-10, verificamos que a expressão de ambas citocinas era similar à dos animais WT 1 dia após a infecção, enquanto que nos tempos de 7 (P<0.05 vs WT), 15 (P<0.05 vs WT), 30 (P<0.05 vs WT) e 60 (P<0.05 vs WT) dias tal expressão era maior do que a detectada nos animais WT infectados (Fig. 42).

Nossos resultados também demonstram que a expressão de IFN- γ era similar entre os animais IL-10KO e WT, enquanto nos animais IL-4KO detectamos um aumento na expressão de IFN- γ aos 30 (P<0.05 vs WT) e 60 (P<0.05 vs WT) dias pi (Fig. 42). Com relação à expressão de IL-12 durante o curso da DP experimental, nossos resultados não demonstram diferenças significativas entre os animais IL-4KO, IL-10KO e WT (Fig. 42). Também verificamos que a expressão de IL-4 é similar entre os animais IL-10KO e WT em todos os tempos analisados. Ao contrário, a expressão de IL-10 era similar nos animais IL-4KO e WT aos 7 e 15 dias pi, enquanto aos 30 (P<0.05 vs WT) e 60 (P<0.05 vs WT) dias de infecção tal expressão é significativamente menor nos animais IL-4KO (Fig. 42). A expressão do gene constitutivo beta-actina foi verificada em todos os tempos analisados (dados não mostrados), sendo utilizada como controle positivo da reação e para normalização dos níveis de expressão de mRNA.



Figura 42 – Cinética de expressão de citocinas nos tecidos periodontais de camundongos IL-4KO e IL-10KO infectados com *A. actinomycetemcomitans.* Amostras de tecido periodontal de camundongos IL-4KO, IL-10KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans* foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL12, IL-4 e IL-10 foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média \pm SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. *p<0.05 vs WT.

Também analisamos a produção de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10 nos tecidos periodontais dos animais IL-4KO e IL-10KO durante o curso da DP experimental, através de ELISA (Fig.43). Nossos resultados confirmam aqueles relativos a expressão de mRNA para tais citocinas, demonstrando um aumento significativo nos níveis de IL-1 β , TNF- α e IFN- γ nos tecidos periodontais dos camundongos IL-4KO e IL-10KO aos 15 e 60 dias após a inoculação dos microrganismos (P<0.05 vs WT). Constatamos também uma redução significativa nos níveis de IL-10 nos tecidos periodontais dos animais IL-4KO no tempo de 60 dias pós infecção (P<0.05 vs WT). Nossos resultados não demonstram alterações significativas nos níveis de IL-4 nos tecidos periodontais dos animais IL-10KO durante o curso da infecção (Fig.43).

4.33. Papel de IL-4 e IL-10 na modulação da expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A*. *actinomycetemcomitans*

Investigamos também o papel de IL-4 e IL-10 na modulação da expressão de quimiocinas e seus receptores nos tecidos periodontais durante o curso da DP experimental (Fig 44 e 45). Constatamos que a expressão de CXCL3 era similar nos animais IL-4KO, IL-10 e WT, em todos os tempos analisados. Por outro lado, a expressão de CXCL1, também envolvida na quimioatração de neutrófilos, se mostrou aumentada nos animais IL-4KO (nos tempos de 15, 30 e 60 dias de infecção; P<0.05 vs WT), assim como nos animais IL-10KO (aos 7, 15, 30 e 60 dias pi; P<0.05 vs WT) quando comparados aos animais WT (Fig. 44). Também constatamos que a expressão de CXCR2 estava significativamente aumentada em ambas linhagens IL-4KO e IL-10KO, nos tempos de 7, 15, 30 e 60 dias após a infecção, quando comparados aos animais WT (P<0.05 vs WT) (Fig. 45).Ao analisarmos a expressão de CCL3, CCL5 e CXCL10,



Figura 43 - Níveis de citocinas nos tecidos periodontais de camundongos IL-4KO e IL-10KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal palatino de camundongos IL-4KO, IL-10KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal foram coletadas, pesadas e homogenizadas, sendo o sobrenadante analisado quanto aos níveis de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10 por ELISA. Os resultados são expressos como pg de citocina por mg de tecido por animal, e representam os valores (média + desvio padrão), provenientes de 2 animais por grupo em cada tempo, representativos de 3 experimentos independentes. *p<0.05 vs WT.



Figura 44 - Cinética de expressão de quimiocinas nos tecidos periodontais de camundongos IL-4KO e IL-10KO infectados com *A. actinomycetemcomitans.* Amostras de tecido periodontal de camundongos IL-4KO, IL-10KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans* foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de CXCL3, CXCL1, CCL3, CCL5, CXCL10 e CCL1 foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média ± SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. *p<0.05 vs WT.



Figura 45 - Cinética de expressão de receptores de quimiocinas nos tecidos periodontais de camundongos IL-4KO e IL-10KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos IL-4KO, IL-10KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans* foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de CXCR2, CXCR3, CCR5 e CCR4 foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média ± SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. *p<0.05 vs WT.



Figura 46 - Cinética de expressão de metaloproteases (MMPs) e inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) nos tecidos periodontais de camundongos IL-4KO e IL-10KO infectados com *A. actinomycetemcomitans.* Amostras de tecido periodontal de camundongos IL-4KO, IL-10KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans* foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média ± SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. *p<0.05 vs WT.

constatamos um aumento significativo na expressão de tais fatores nos tecidos periodontais dos animais IL-4KO (aos 30 e 60 dias de infecção; P<0.05 vs WT) e IL-10KO (aos 7, 15, 30 e 60 dias pi; P<0.05 vs WT) (Fig. 44). O mesmo foi verificado com relação a expressão dos receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR3, cuja expressão se mostrava significativamente aumentada nos animais IL-4KO (aos 30 e 60 dias pi; P<0.05 vs WT) e IL-10KO (aos 7, 30 e 60 dias pi; P<0.05 vs WT), quando comparados aos animais WT (Fig. 45).

Ao analisarmos a expressão de CCL1 e seu receptor CCR4, não foram constatadas diferenças significativas entre os animais IL-10KO e WT. Ao contrário, nos camundongos IL-4KO a expressão de CCL1 e CCR4 se encontrava significativamente reduzida aos 30 (P<0.05 vs WT) e 60 (P<0.05 vs WT) dias após a infecção com *A. actinomycetemcomitans* (Fig. 44 e 45). A expressão do gene constitutivo beta-actina foi verificada em todos os tempos analisados (dados não mostrados), sendo utilizada como controle positivo da reação e para normalização dos níveis de expressão de mRNA.

4.34. Papel de IL-4 e IL-10 na modulação da expressão de metaloproteases (MMPs), RANKL e seus respectivos inibidores (TIMPs e OPG) nos tecidos periodontais de camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*

Investigando os possíveis mecanismos pelos IL-4 e IL-10 estariam modulando a destruição tecidual e conseqüentemente a severidade da DP, nosso próximo passo foi analisar a expressão de mediadores potencialmente envolvidos na destruição tecidual nas DPs (Fig. 46 e 47). Constatamos que a expressão de MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-9) nos tecidos periodontais de animais IL-4-KO e WT se encontrava em níveis similares aos 1, 7 e 15 dias de infecção. Ao contrário, aos 30 e 60 dias pi tal expressão se mostrava significativamente mais intensa nos animais IL-4KO (P<0.01 vs WT). Com relação aos animais IL-10KO, a



Figura 47 - Cinética de expressão de RANKL, OPG e catepsina K nos tecidos periodontais de camundongos IL-4KO e IL-10KO infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Amostras de tecido periodontal de camundongos IL-4KO, IL-10KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans* foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de RANKL, OPG e catepsina K foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média ± SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. *p<0.05 vs WT.

expressão de MMP-1, MMP-2 e MMP-9 se mostrou similar a dos animais WT 1 dia após a infecção, enquanto aos 7, 15, 30 e 60 dias de infecção tal expressão é significativamente maior nos animais IL-10KO (P<0.01 vs WT) do que nos animais WT (Fig. 46). Analisando os níveis de expressão de expressão de RANKL e catepsina K nos animais IL-4KO e IL-10KO, verificamos que aos 30 (P<0.01 vs WT) e 60 dias (P<0.01 vs WT) pós-infecção a expressão de tais fatores era significativamente maior tanto nos animais IL-4KO como nos camundongos IL-10KO, quando comparados aos animais WT (P<0.01 vs WT) (Fig. 47).

Ao contrário do verificado com relação a expressão de MMPs, RANKL e catepsina K, nossos dados demonstram uma redução na expressão TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e OPG aos 30 e 60 dias de infecção nos animais IL-4KO (P<0.01 vs WT). Com relação aos animais IL-10KO, nossos resultados demonstram uma redução da expressão de TIMP-1 e TIMP-3 em todos os tempos analisados, de 0h a 60 dias de infecção (P<0.01 vs WT), quando comparados aos animais WT (Fig. 46). A expressão de TIMP-2 também se mostra reduzida nos animais IL-10KO comparados aos WT, aos 7, 30 e 60 dias de infecção (P<0.01 vs WT) (Fig. 46). A expressão do gene constitutivo beta-actina foi verificada em todos os tempos analisados (dados não mostrados), sendo utilizada como controle positivo da reação e para normalização dos níveis de expressão de mRNA.

4.35. Papel do IL-4 e IL-10 na modulação da infecção experimental por A. *actinomycetemcomitans*

Investigando o papel de IL-4 e IL-10 no controle da infecção periodontal, animais IL-4KO e IL-10KO inoculados com *A. actinomycetemcomitans* foram analisados com relação à carga bacteriana presente nos tecidos periodontais, a resposta de fase aguda, assim como quanto ao ganho de peso durante o curso da doença (Fig. 48). Verificamos que a carga bacteriana nos tecidos periodontais dos animais IL-4KO se mostrava maior do que nos animais WT nos tempos de 7 (P<0.01 vs WT), 30 (P<0.01 vs WT) e 60 (P<0.01 vs WT) dias de infecção. Ao analisarmos os níveis da infecção dos animais IL-10KO, constatamos que a intensidade de detecção do DNA de *A. actinomycetemcomitans* nos tecidos periodontais é similar entre os animais IL-10KO e WT, a exceção do tempo de 15 dias, no qual detectamos menores níveis de *A. actinomycetemcomitans* nos tecidos dos animais IL-10KO (P<0.01 vs WT) (Fig. 48).

Ao analisarmos a resposta de fase aguda, constatamos que animais WT, IL-4 e IL-10 não apresentaram diferenças entre os níveis de expressão de mRNA para proteína C reativa no fígado. Ao contrário, nossos resultados demonstram que a os níveis séricos de CRP eram maiores nos animais IL-4KO aos 30 dias após a infecção por *A. actinomycetemcomitans* (Fig. 48). Ao analisarmos o ganho de peso apresentado pelos animais durante o curso da infecção, nossos resultados não demonstram diferenças entre os animais IL-4KO infectados ou não infectados, assim como entre os animais IL-10KO infectados ou não infectados (Fig. 48). Além disso, não foram verificadas mortes em nenhum dos grupos experimentais, IL-4KO, IL-10KO e WT infectados com *A. actinomycetemcomitans*, durante os 60 dias de infecção (dados não mostrados).

4.36. Papel de IL-4 e IL-10 na modulação de fatores antimicrobianos durante o curso da doença periodontal experimental induzida por *A. actinomycetemcomitans*

Finalmente, camundongos IL-4KO, IL-10KO e C57BL/6 infectados com *A. actinomycetemcomitans* foram analisados com relação a expressão de iNOS, atividade de MPO, assim como quanto a produção de anticorpos durante o curso da DP experimental (Fig. 49). Constatamos que os animais IL-4KO apresentaram maiores níveis de expressão de iNOS quando comparados aos animais WT aos 30 e 60 dias de infecção (P<0.01 vs WT). De forma similar, constatamos que a expressão de iNOS nos tecidos dos animais IL-10KO

se mostrava significativamente aumentada aos 15, 30 e 60 dias pi (P<0.01 vs WT). Ao analisarmos a atividade de MPO nos tecidos periodontais dos animais IL-4KO e WT, infectados com *A. actinomycetemcomitans*, não foram detectadas diferenças significativas. Com relação aos camundongos IL-10, nossos resultados demonstram um aumento significativo na atividade de MPO nos tecidos periodontais no tempo de 60 dias (P<0.01 vs WT) após a inoculação dos microrganismos (Fig. 49).

Finalmente, investigamos os níveis séricos de anticorpos específicos para A. actinomycetemcomitans. Nossos resultados demonstraram que os títulos de IgG total estavam significativamente reduzidos nos animais IL-4KO quando comparados aos animais WT aos 30 (P<0.001 vs WT) e 60 (P<0.001 vs WT) dias de infecção. Ao contrário, não foram verificadas diferenças entres títulos de anticorpos específicos para os Α. actinomycetemcomitans no soro dos animais IL-10KO e WT, em nenhum dos tempos analisados (Fig. 49).



Figura 48 - Quantificação da carga bacteriana nos tecidos periodontais e resposta sistêmica à infecção de camundongos IL-4KO e IL-10KO por *A. actinomycetemcomitans.* Amostras de tecido periodontal de camundongos IL-4KO, IL-10KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans,* foram analisados quanto a carga bacteriana nos tecidos periodontais (média \pm SD níveis de expressão de DNA de *A. actinomycetemcomitans,* RealTimePCR); resposta de fase aguda (média \pm SD níveis de expressão de mRNA de CRP no fígado; média \pm SD dos níveis de CRP em µg/ml soro), assim como quanto ao ganho de peso durante o curso da doença (média \pm SD do peso de 3 camundongos em cada tempo analisado). Resultados representativos de 3 experimentos independentes. *p<0.05 vs WT.



Figura 49 - Produção de mediadores antimicrobianos durante o curso da doença periodontal experimental induzida por *A. actinomycetemcomitans* em camundongos IL-4KO e IL-10KO. Camundongos IL-4KO, IL-10KO e C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A. actinomycetemcomitans* foram analisados quanto a da expressão de mRNA para iNOS (média ± SD, da intensidade de expressão de mRNA, normalizado pela beta-actina, obtidos de 2 animais em cada tempo), níveis MPO nos tecidos periodontais (média ± SD da DO referente a atividade de MPO nos tecidos periodontais por animal, normalizados pelo peso do tecido, pool de 5 animais em cada tempo). Amostras de soro foram utilizadas para a detecção de anticorpos específicos para *A. actinomycetemcomitans* por ELISA (média ± SD, dos títulos de anticorpos específicos para *A. actinomycetemcomitans* por ELISA (média ± SD, dos títulos de 3 experimentos independentes.*p<0.05 vs WT; .**p<0.001 vs WT.

	TNFp55-KO	IFN-γKO	IL-12KO	IL-4KO	IL-10KO
Resposta Inflamatória	$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$	#(↓)	$\uparrow \uparrow \uparrow$	$\uparrow \uparrow$
Reaborção Óssea Alveolar	$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$	$\downarrow \downarrow \downarrow$	$\#\left(\downarrow ight)$	$\uparrow \uparrow \uparrow$	$\uparrow \uparrow$
Mediadores Inflamatórios	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$	$\#\left(\downarrow ight)$	$\uparrow \uparrow$	$\uparrow \uparrow \uparrow$
Mediadores Anti Inflamatórios	† †	† †	#	$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$
MMPs / RANKL	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$	#	† †	$\uparrow \uparrow \uparrow$
TIMPs / OPG	† †	† †	#	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$
Carga Bacteriana	$\uparrow \uparrow \uparrow$	$\uparrow \uparrow \uparrow$	#	Ť	#
Resposta Fase Aguda	↑ ↑	↑ ↑↑	#	Ť	#
iNOS / MPO	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$	#	↑	1
Anticorpos	#	#	#	$\downarrow\downarrow$	#

↑ : regulação positiva; ↓ : regulação negativa; () discreta alteração; # : sem alterações significativas

Figura 50. Participação de citocinas na imunomodulação da doença periodontal experimental induzida por *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Resumo esquemático dos resultados relativos aos mecanismos pelos quais as citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-4 e IL-10 participam da modulação da severidade da doença periodontal experimental, e do controle da infecção experimental por *A. actinomycetemcomitans*. A legenda representa as alterações observadas [\uparrow : regulação positiva; \downarrow : regulação negativa; ():discreta alteração; #: sem alterações significativas] com relação aos animais WT.

DISCUSSÃO

The second state of the second of the second s

5. DISCUSSÃO

As doenças periodontais (DPs) são alterações crônicas inflamatórias dos tecidos de suporte dos órgãos dentais, cuja etiologia é dependente da presença de bactérias periodopatogênicas. Apesar da presença de microrganismos periodontopatogênicos ser fundamental para o início do desenvolvimento de doença, a amplificação e progressão desse processo são altamente dependentes da resposta imune e inflamatória gerada pelo hospedeiro em resposta às bactérias ou a seus produtos. Acredita-se que a tal resposta seja responsável pela proteção do hospedeiro contra a infecção bacteriana, contudo, não se conhece qual o nível de tal proteção, uma vez que diversos estudos têm demonstrado que tais doenças podem atuar como modificadoras da saúde sistêmica dos pacientes, predispondo a ocorrência ou ao agravamento de diversos estados patológicos (LOESCHE 1993, AAP 1996, PAGE 1998, AAP 1999, EBERSOLE & CAPPELLI 2000, FOWLER *et al.* 2001, KINANE & LAPPIN 2001, SUSIN *et al.* 2004).

Diversas citocinas têm sido identificadas em lesões periodontais, porém, os papéis desempenhados por tais mediadores na patogênese das DPs, assim como os mecanismos envolvidos em tal processo permanecem pouco conhecidos (GENCO 1992, KINANE & LAPPIN 2001, SEYMOUR & GEMMEL 2001, TENG 2003).

Tendo como objetivo investigar a participação de citocinas na imunomodulação da doença periodontal experimental induzida por *A. actinomycetemcomitans*, investigamos inicialmente o desenvolvimento da DP em camundongos C57BL/6. Como previamente demonstrado (GARLET *et al. in press*), a infecção com *A. actinomycetemcomitans* leva ao desenvolvimento de um infiltrado inflamatório nos tecidos periodontais (Fig. 1), principalmente no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio juncional e nas proximidades da crista óssea alveolar (Fig. 2). Diversos tipos celulares caracteristicamente presentes em lesões

periodontais humanas, como neutrófilos, macrófagos, linfóctios T CD4, T CD8 e B podem ser encontrados em números elevados nos tecidos dos animais infectados (Fig.3). Além disso, os animais infectados apresentam aumento significativo da área compreendida entre a junção amelo-cementária e a crista óssea alveolar, representativa de reabsorção óssea alveolar (Fig. 1). De forma interessante nossos resultados demonstram dois distintos padrões de progressão da doença durante o período analisado. Durante fase inicial da doença, compreendida entre a inoculação dos microrganismos até 30 dias pós-infecção, verifica-se um grande aumento na quantidade de células inflamatórias e na intensa reabsorção óssea alveolar. Ao contrário, entre 30 e 60 dias de infecção, considerada a fase tardia da doença, o número de células inflamatórias permanece constante, e a taxa de reabsorção óssea verificada foi significativamente menor do que no período inicial (Fig. 1).

Uma vez que as citocinas produzidas nos tecidos peridontais supostamente estariam envolvidas na determinação da severidade da doença, comparamos a cinética de expressão de tais fatores com os diferentes padrões de progressão identificados no curso da doença. Nossos resultados demonstram que durante a fase inicial da DP experimental predomina nos tecidos periodontais uma resposta imune do tipo Th1, caracterizada pela presença de citocinas proinflamatórias e do tipo Th1: TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e IL-12 (Fig. 4 e 5). Por outro lado a fase tardia da doença se caracteriza pela intensa expressão de mediadores Th2, como IL-4 e IL-10, além da persistência da expressão de mediadores Th1, porém em níveis menores que os verificados anteriormente (Fig. 4 e 5). O desenvolvimento de tal padrão seqüencial de expressão de citocinas já havia sido previamente descrito em resposta a inoculação de LPS nos tecidos periodontais de camundongos, contudo sua relevância para a progressão da doença não havia sido investigada (IWASAKI *et al.* 1998).

Nossos resultados também demonstram que o padrão de expressão de quimiocinas e de migração celular também parece obedecer a uma cinética similar. No período inicial da infecção, se verifica predomínio da expressão de CCL3, CCL5, CXCL10, e dos receptores CCR5 e CXCR3 (Fig. 6 e 7), os quais caracteristicamente atuam na quimioatração de linfócitos Th1 e macrófagos (MANTOVANI et al. 1999, ROSSI & ZLOTNIK 2001, GERARD & ROLLINS 2001, LUTHER & CYSTER 2001, ROT et al. 2004). De fato, verificamos que durante esse período, macrófagos e linfócitos estavam presentes em número significativo para os tecidos periodontais dos animais infectados com Α. actinomycetemcomitans (Fig. 3). Além disso, constatamos uma intensa migração de neutrófilos (Fig. 3), associada a expressão de CXCL3, CXCL1 CXCR2 (Fig. 3, 6 e 7). De fato, tais quimiocinas e seu receptor estão envolvidos na quimioatração de neutrófilos (ROSSI & ZLOTNIK 2001, GERARD & ROLLINS 2001). Por outro lado, na fase tardia da doença, detectamos a expressão de CCL1 e CCR4 (Fig. 6 e 7), caracteristicamente associados à migração de linfócitos com fenótipo Th2 (ROSSI & ZLOTNIK 2001, GERARD & ROLLINS 2001, LUTHER & CYSTER 2001, ROT et al. 2004). A presença de células Th2 na lesão poderia potencializar quimiatração de linfócitos B e a produção local de anticorpos nos tecidos periodontais (MANTOVANI et al. 1999, GERARD & ROLLINS 2001, LUTHER & CYSTER 2001). De fato, após 30 dias de infecção, também se verifica a presença de um elevado número de linfócitos B nos tecidos periodontais (Fig. 3).

Dessa forma, nossos resultados demonstram que durante a fase inicial da doença se verifica a predominância de uma resposta imune do tipo Th1, a qual está associada a um grande aumento na quantidade de células inflamatórias e intensa reabsorção óssea. Ao contrário, após o surgimento dos mediadores do tipo Th2, que caracterizam o início da fase tardia da doença, o número de células inflamatórias permanece constante, e a taxa de reabsorção óssea era significativamente menor. Tais resultados estão de acordo com um estudo prévio, que demonstrava uma expressão predominante de quimiocinas e citocinas do tipo Th2 associada a peridontite crônica (de progressão lenta e menos grave), enquanto a

expressão de quimiocinas e citocinas do tipo Th1 predominava na periodontite agressiva (de caráter mais severo e progressão mais rápida) (GARLET *et al.* 2003). Nesses mesmos grupos de pacientes, demonstrou que a expressão de citocinas do tipo Th1 estava positivamente correlacionada à expressão de MMPs e RANKL (potencialmente envolvidos na destruição tecidual), enquanto a expressão de IL-4 e IL-10 apresentava correlações com a expressão de TIMPs e OPG (potencialmente envolvidos no controle da severidade da doença)(GARLET *et al.* 2004). De fato, estudos demonstram que a regulação dos sistemas MMPs/TIMPs e RANKL/OPG por citocinas parece ser decisiva na progressão de diversos processos patológicos (KONG *et al.* 1999, YOSHIHARA *et al.* 2000, ROMAS *et al.* 2002, SCHULZE *et al.* 2003, LANCHOU *et al.* 2003, KATRIB *et al.* 2003).

Nesse sentido, nosso próximo passo foi investigar a expressão de MMPs/TIMPs e RANKL/OPG no curso da doença periodontal experimental. Constatamos inicialmente que tanto MMPs como TIMPs são constitutivamente expressos nos tecidos periodontais saudáveis, porém, em baixos níveis. De fato, a expressão de MMPs e TIMPs tem sido descrita em tecidos periodontais humanos saudáveis, sendo sugerido o envolvimento de tais moléculas no "turnover" fisiológico da matriz extracelular (SODEK & OVERALL 1992, RYAN *et al.* 1996). Ao analisarmos a expressão de MMPs/TIMPs nos tecidos peridontais dos animais infectados com *A. actinomycetemcomitans*, identificamos novamente dois padrões distintos de expressão de tais fatores durante o curso da doença. Na fase inicial da doença verificamos um aumento significativona expressão das MMPs, enquanto apenas um pequeno aumento na expressão de TIMPs foi verificado. Em contraste, após 30 dias de infecção uma redução significativa na expressão de MMPs e um aumento significativo na expressão de TIMPs foram detectados (Fig. 8).

De fato, uma expressão elevada de MMPs tem sido identificada nos tecidos periodontais inflamados, a qual parece ter participação efetiva tanto na destruição de tecido

conjuntivo como na reabsorção óssea (BIRKEDAL-HANSEN 1993, AIBA et al. 1996, INGMAN et al. 1996, RAMAMURTHY et al. 2002, DELAISSE et al. 2003, GARLET et al. 2004). Com relação aos níveis de TIMPs, certos estudos demonstram uma diminuição em seus níveis em tecidos doentes (ALEXANDER & DAMOULIS 1994, SOELL et al. 2002, TUTER et al. 2002), sugerindo que o aumento de MMPs e a concomitante redução de TIMPs levariam a um desbalanço entre tais fatores, resultado em destruição tecidual. Ao contrário, outros estudos afirmam que a expressão de TIMPs está aumentada em tecidos periodontais doentes (HAERIAN et al. 1995, NOMURA et al. 1998, ALPAGOT et al. 2001, GARLET et al. 2004), o que poderia ser reflexo de uma tentativa de manutenção da homeostasia tecidual frente à aumentada expressão de MMPs. Contudo, a regulação positiva de TIMPs poderia não ser suficiente para compensar o maior aumento verificado na expressão de MMPs, mais uma vez, desregulando o balanço e levando a destruição tecidual. Um estudo recentemente publicado demonstrou que A. actinomycetemcomitans, além ativar a produção de MMPs por células do ligamento periodontal *in vitro*, leva a diminuição dos níveis de TIMPs produzidos por tais células (TIRANATHANAGUL et al. 2004).

De qualquer forma, alterações no balanço do sistema MMPs/TIMPs (baixos níveis de TIMPs e/ou altos níveis de MMPs), estão envolvidas na patogênese de diversos processos patológicos (SCHULZE *et al.* 2003, LANCHOU *et al.* 2003), incluindo a artrite reumatóide (AR) (KONG *et al.* 1999, YOSHIHARA *et al.* 2000, ROMAS *et al.* 2002KATRIB *et al.* 2003,). Paralelos entre DP e AR serão utilizados com freqüência nesta discussão, uma vez tais patologias apresentam aspectos em comum, como a natureza crônica da resposta inflamatória, a intensa destruição tecidual e reabsorção óssea, além da maior prevalência e maior severidade da DP nos pacientes com AR (MERCADO *et al.* 2003, MIRANDA *et al.* 2003).

Além da destruição tecidual potencialmente mediada pelas MMPs, a reabsorção óssea alveolar mediada por osteoclastos é característica das DPs. Nesse sentido, também examinamos a expressão do fator osteoclastogênico RANKL, de seu inibidor OPG e da catepsina K, uma enzima chave no processo de reabsorção óssea (TEITELBAUM 2000, DELAISE *et al.* 2003). Nossos resultados demonstraram que a cinética de expressão de RANKL/OPG apresenta um padrão similar à expressão de MMPs/TIMPs. A fase inicial da doença, caracterizada pela sua rápida progressão, é associada com alta expressão de RANKL e catepsina K, e uma baixa expressão de OPG. Ao contrário, menores níveis de expressão de catepsina K e RANKL e alta expressão de OPG foram detectados no período tardio da DP experimental (Fig. 9). De fato, estudos sugerem que o balanço entre RANKL e OPG está envolvido na determinação da severidade da DP humana (LIU *et al.* 2003, CROTTI *et al.* 2003, MOGI *et al.* 2004, GARLET *et al.* 2004). Tal hipótese é sustentada por estudos que demonstram que RANKL está claramente associado com a reabsorção óssea, e que o bloqueio de RANKL por OPG inibe de forma efetiva tal processo (TENG *et al.* 2000, TEITELBAUM 2000, RITCHLIN *et al.* 2003).

Em conjunto, nossos resultados sugerem que na fase inicial da doença a intensa produção de mediadores inflamatórios e Th1, como TNF- α , IFN- γ e IL-12, estaria induzindo o aumento na expressão de MMPs e RANKL, e desta forma, determinando a rápida progressão da doença. Por outro lado, a expressão de IL-4 e IL-10 seria responsável pelo aumento na expressão de TIMPs e OPG, atenuando a progressão da doença. De fato, nossos resultados demonstram correlações positivas entre a expressão de IL-1 β , TNF- α e IFN- γ com a expressão de MMP-1 e RANKL, assim como entre IL-4 e IL-10 com TIMP-1 e OPG (Fig. 10). Tais resultados fornecem evidências interessantes a respeito do papel de tais citocinas na determinação da severidade da DP experimental, porém, sua relevância para o controle da infecção periodontal permanece desconhecida.

Ao investigarmos a cinética de infecção pelo *A. actinomycetemcomitans,* constatamos que tal microrganismo pode ser detectado nos tecidos periodontais em níveis crescentes no

período entre 1 e 15 dias após sua inoculação, e então se mantém em níveis estáveis durante o curso da doença (Fig. 11). Nossos resultados também demonstram a presença nos tecidos periodontais de mediadores antimicrobianos potencialmente envolvidos no controle da infecção periodontal. Constatamos uma intensa atividade de mieloperoxidase (MPO) 1 dia após a infecção, e apesar de uma redução significativa, tal atividade se mostrava presente durante todo o curso da doença (Fig. 12). De fato, estudos demonstram que neutrófilos estimulados com periodontopatógenos produzem MPO (TAICHMAN et al. 1977, MIYASAKI et al. 1997), e tal enzima se mostra eficiente na morte de diferentes periodontopatógenos, incluindo o A. actinomycetemcomitans (MIYASAKI et al. 1986, MIYASAKI et al. 1991A, MIYASAKI et al. 1991B); ou mesmo na inativação de sua leucotoxina (CLARK et al. 1986). Além disso, a presença de MPO em tecidos periodontais doentes tem sido relatada em diversos estudos, mas normalmente investigada como um marcador do nível de inflamação local (YAMALIK et al. 2000, LISKMANN et al. 2004). Nossos resultados também demonstram a expressão de iNOS (a principal enzima envolvida na indução da produção de NO) nos tecidos periodontais em altos níveis na fase inicial da doença, porém reduzidos após 30 dias de infecção (Fig. 12). De fato, tanto a expressão da enzima iNOS como a produção de NO se encontram elevadas no periodonto em estado de doença (MATEJKA et al. 1998, LAPPIN et al. 2000, HIROSE et al. 2001, BATISTA et al. 2002). Estudos também demonstram que LPS de bactérias periodontopatogênicas tem a capacidade de estimular a síntese de NO em células humanas e murinas (BLIX et al. 1998), e que a ausência de iNOS leva ao aumento na suscetibilidade a infecção por P. gingivalis em um modelo de infecção em câmara subcutânea em camundongos (GYURKO et al. 2003). Além disso, a produção de NO mediada por iNOS também parece estar envolvida na destruição tecidual vista nas DPs (LOHINAI et al. 1998, KENDALL et al. 2001). Também verificamos a presença de elevados títulos de anticorpos específicos para A.

actinomycetemcomitans no soro dos camundongos infectados, principalmente após 30 dias pós infecção (Fig. 12). O desenvolvimento de uma resposta humoral, com a produção de anticorpos contra periodontopatógenos tem sido verificada em diferentes modelos experimentais, sendo geralmente correlacionada com a atenuação da severidade da doença (BEHLING *et al.* 1981, CLARK *et al.* 1991, PERSSON *et al.* 1994, GIBSON FC 3RD *et al.* 2003).

Apesar da presenca de diferentes moléculas potencialmente envolvidas no controle da infecção (MPO, iNOS e anticorpos), constatamos que os animais infectados com A. actinomycetemcomitans apresentavam uma intensa resposta de fase aguda, representada pela detecção de proteína C reativa (CRP) no soro e no fígado (a nível de mRNA) dos animais a partir de 7 dias pós infecção e durante todo o curso da doença (Fig. 11). De acordo com nossos resultados, estudos demonstram uma associação entre os níveis séricos de CRP e a infecção periodontal, e sugerem uma possível relação aos efeitos deletérios da DP em relação à saúde sistêmica dos pacientes (SLADE et al. 2000, NOACK et al. 2001, MATTILA et al. 2002, D'AIUTO et al. 2004). De fato, a CRP é comumente encontrada em baixos níveis no soro de indivíduos normais, porém em níveis 100 a 200 vezes mais elevados durante inflamação sistêmica aguda (GABAY et al. 1999). O aumento nos níveis de CRP é um importante fator de risco para aterosclerose, infarto do miocárdio e doenças vasculares periféricas, e está positivamente correlacionado com perda de peso, síndrome de anorexia e caquexia (RIDKER et al. 1997, MAHMOUD et al. 2002, BACKES et al. 2004). Apesar de termos constatado a ocorrência de níveis significantes de CRP no soro dos animais infectados durante o curso da DP, não foram verificadas alterações com relação ao ganho de peso apresentado pelos camundongos infectados no período analisado (Fig. 11).

Tais resultados fornecem evidências interessantes a respeito do possível envolvimento de MPO, iNOS e da produção de anticorpos no controle da infecção periodontal. Contudo, os

resultados até aqui apresentados não nos permitem estabelecer o nível de proteção conferido por tal resposta, assim como analisar o real papel de tais fatores no controle da infecção por *A*. *actinomycetemcomitans*. Nesse sentido, buscando esclarecer o papel das citocinas na imunomodulação da DP experimental, realizamos a infecção com *A*. *actinomycetemcomitans* em diferentes linhagens de camundongos geneticamente modificados. A utilização de tais animais, nos quais o gene responsável pela codificação de uma citocina de interesse ou seu receptor é eliminado, nos permite a análise precisa dos mecanismos pelos quais cada citocina atua na imunopatogênese da doença periodontal, demonstrando uma relação causa e efeito, e não nos limitando a associações temporais que podem ser apenas casuais.

Embora alguns estudos demonstrem associação entre citocinas pro-inflamatórias na imunopatogênese das DPs, os mecanismos pelos quais o TNF- α modula a reação inflamatória e destruição tecidual não são conhecidos. Nesse sentido, realizamos a inoculação de *A. actinomycetemcomitans* em camundongos geneticamente deficientes do receptor p55 de TNF- α (TNFp55-KO), a partir dos quais analisamos diversos fatores potencialmente envolvidos na patogênese das DPs. Constatamos inicialmente que nos animais TNFp55KO infectados com *A. actinomycetemcomitans* o número de leucócitos nos tecidos periodontais estava significativamente reduzido quando comparados aos animais WT (Fig. 13 e 14). Ao analisarmos o fenótipo de tais células através de citometria de fluxo, verificamos que neutrófilos (células GR1+), macrófagos (F4/80+), linfócitos T CD4 (CD3+CD4+), linfócitos T CD8 (CD3+CD8+) e linfócitos B (CD19+) se encontravam em menor número nos animais TNFp55KO (Fig. 15). Nossos resultados também demonstram que a reabsorção óssea alveolar estava significativamente reduzida nos animais TNFp55-KO quando comparada aos animais WT (Fig. 13).

De acordo com tais dados, estudos demonstram que a ausência do receptor p55 está ligada a diminuição da resposta inflamatória (TAK et al. 1996, KONDO et al. 1997,
PESCHON *et al.* 1998, BRITO *et al.* 1999) e reabsorção óssea alveolar em resposta a estímulos microbianos (ABU-AMER *et al.* 1997, MERKEL *et al.* 1999, CHIANG *et al.*1999, GOLDRING *et al.* 2000). Além disso, a inibição de TNF- α leva a redução da migração de leucócitos aos tecidos periodontais, da reabsorção óssea alveolar e da perda de inserção conjuntiva em modelos experimentais de DP (ASSUMA *et al.* 1998, GRAVES *et al.* 1998, DELIMA *et al.* 2001, GRAVES *et al.* 2001, OATES *et al.* 2002). Contudo, os mecanismos moleculares pelos quais TNF- α modula a resposta inflamatória e a severidade da DP não são conhecidos.

Buscando responder tal questão, inicialmente investigamos a expressão dos quimioatraentes de neutrófilos, CXCL3 e CXCL1 (FREVERT 1995A/B, D'AMBROSIO *et al.* 2003, ROT *et al.* 2004), nos tecidos periodontais durante o curso da DP experimental. Verificamos que a expressão de CXCL3, CXCL1 e CXCR2 estava reduzida nos animais TNFp55-KO (Fig. 18 e 19). Como previamente descrito, o número de neutrófilos nos tecidos periodontais dos animais TNFp55-KO (Fig. 18 e 19). Como previamente descrito, o número de neutrófilos nos tecidos periodontais dos animais TNFp55-KO é significativamente menor que nos animais WT (Fig. 13). De acordo com tais resultados, estudos demonstram que TNF- α modula a expressão de CXCL3 e CXCL3 e CXCL1; e conseqüente, regula o recrutamento de neutrófilos (TESSIER *et al.* 1997, MIZGERD *et al.* 2001, ALCAMO *et al.* 2001).

Nossos resultados também demonstram que a expressão de CCL3, CCL5, CXCL10, e dos receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR3, estava significativamente reduzida nos animais TNFp55-KO (Fig. 18 e 19). Tais quimiocinas e receptores estão caracteristicamente envolvidos na quimioatração de células T CD4 com fenótipo Th1 e macrófagos (ROSSI & ZLOTNIK 2000, LUTHER & CYSTER 2001, D'AMBROSIO *et al.* 2003, ROT *et al.* 2004), e de fato, tanto linfócitos T e macrófagos foram encontrados em menor número nos animais TNFp55-KO (Fig. 15). Além disso, tais quimiocinas são amplamente expressas em tecidos periodontais doentes, estando sua expressão supostamente relacionada com a severidade da

doença (GAMONAL et al. 2001, GEMMEL et al. 2001, GARLET et al. 2003, GARLET et al. in press).

De fato, estudos demonstram que TNF- α e TNFp55 estão diretamente ligados a expressão de diversas quimiocinas (TESSIER et al. 1997, CZERMAK et al. 1999, SEDGWICK et al. 2000, VADAY et al. 2001, BORISH & STEINKE 2003), sendo que a regulação negativa em amplo espectro da expressão de quimiocinas, vista nos animais TNFp55KO, possivelvemente se deve a ausência direta de tal receptor. Contudo, tal expressão também pode ser influenciada pela regulação negativa de outros mediadores inflamatórios, como a IL-1β (Fig. 16 e 17), também envolvida na indução da expressão de quimiocinas (SEDGWICK et al. 2000, ROSSI & ZLOTNIK 2000, LUTHER & CYSTER 2001, VADAY et al. 2001, BORISH & STEINKE 2003, D'AMBROSIO et al. 2003, ROT et al. 2004). Além disso, a menor expressão de CXCL10 poderia ser explicada pela redução nos níveis de IFN-y nos tecidos periodontais dos animais TNFp55-KO (Fig. 16 e 17)(FARBER et al. 1997, SEBASTIANI et al. 2002, MCLOUGHLIN et al. 2003). Por outro lado, a expressão da quimiocina CCL1 e do receptor CCR4 e CCR8, ligados a respostas do tipo Th2, não foi alterada pela ausência do TNFp55. Desta forma, podemos concluir que a redução na expressão de quimiocinas e de outras citocinas inflamatórias, apresentada pelos animais TNFp55-KO, seria responsável pela redução da migração de células inflamatórias em resposta a infecção por A. actinomycetemcomitans.

Além de seu papel na migração celular, TNF-α está potencialmente envolvido na geração de mediadores potencialmente envolvidos na destruição dos tecidos periodontais (TAUBMAN & KAWAI 2001, GRAVES & COCHRAM 2003). Nosso próximo passo, portanto, foi investigar a expressão de MMPs e RANKL, e seus respectivos inibidores, TIMPs e OPG, nos tecidos periodontais dos animais TNFp55-KO. Constatamos que a expressão de MMPs e RANKL, assim como da enzima catepsina K, era significativamente menor nos

animais TNFp55-KO infectados, quando comparados aos animais WT (Fig. 20 e 21). De fato, estudos prévios demonstram claramente que o receptor p55 de TNF-α está envolvido no dano tecidual mediado por MMPs (PENDER *et al.* 1998, MAJKA *et al.* 2002, FERNANDES *et al.* 2002), assim como contribui para a reabsorção óssea inflamatória (ABU-AMER *et al.* 1997, MERKEL *et al.* 1999, AZUMA *et al.* 2000, GERSTENFELD *et al.* 2003), em mecanismos que podem ser dependentes (ZOU W 2001) ou independentes de RANKL (SABOKBAR *et al.* 2003). Ao analisarmos a expressão de TIMPs e OPG nos animais TNFp55KO, constatamos que a expressão de TIMP-1 e OPG se mostrava aumentada nos tempos de 7 e 15 dias, TIMP-2 apresentava-se em níveis mais intensos aos 30 e 60 dias de infecção. Tal aumento na expressão de TIMPs e OPG poderia ser devido a maior expressão de IL-10 vista nos animais TNFp55KO (Fig. 16 e 17) (KAWASHIMA & STASHENKO 1999, SASAKI *et al.* 2000). Entretanto, a expressão de IL-4, também caracteristicamente envolvida na indução de TIMPs e OPG (KAWASHIMA & STASHENKO 1999, SASAKI *et al.* 2000), é similar nos animais TNFp55-KO e WT em todos tempos analisados (Fig. 16 e 17).

Tais resultados nos permitem sugerir que a ausência direta de TNFp55, possivelmente somada aos efeitos indiretos na regulação negativa de IL-1β, leva a menor expressão de MMPs e RANKL nos animais TNFp55-KO (DAYER & BURGER 1994, ABU-AMER *et al.* 1997, REKDAL *et al.* 1996, BESSIS & BOISSIER 2001, MOHAMMED *et al.* 2003, SEBASTIANI *et al.* 2002). Além disso, a manutenção ou ligeiro aumento nos níveis de TIMPs, OPG e IL-10, também estariam envolvidos na significativaatenuação da perda óssea alveolar nos apresentada pelos animais TNFp55-KO.

Entretanto, apesar da menor severidade da DP apresentada pelos animais deficientes de TNFp55, tal deficiência resulta no comprometimento da resposta imune à infecção por *A. actinomycetemcomitans*, uma vez que tais animais apresentam um grande aumento na carga bacteriana nos tecidos periodontais, quando comparados aos camundongos WT (Fig. 22). Em

concordância com nossos resultados, diversos estudos demonstram a deficiência do receptor p55 de TNF- α leva a um severo comprometimento da eliminação de ampla variedade de patógenos, que freqüentemente resulta na morte de tais animais (PFEFFER *et al.* 1993, STEINSHAMN *et al.* 1996, SOUTO *et al.* 2000, MIZGERD *et al.* 2001, T ALIBERTI *et al.* 2001, HALMAIER *et al.* 2002). Apesar de não termos constatado mortes no grupo de animais TNFp55KO infectados com *A. actinomycetemcomitans* (dado não mostrado), constatamos um aumento na resposta de fase aguda em tais animais, além de uma significativaredução no ganho de peso durante o curso da infecção (Fig. 22). Apesar de TNF- α apresentar um importante papel na indução de respostas de fase aguda, camundongos TNFp55-KO exibem resposta de fase aguda em resposta a endotoxina bacteriana similar aos animais WT (LEON *et al.* 1997), a qual pode ser mediada por outras citocinas inflamatórias como IL-1 β e IL-6 (KOJ *et al.* 1996, FANTUZZI & DINARELLO 1996, LABOW *et al.* 1997, RAMADORI *et al.* 1999).

Podemos sugerir que o comprometimento da resposta protetora contra a infecção por A. actinomycetemcomitans apresentado pelos animais TNFp55-KO possa estar relacionado a reduzida quimioatração de fagócitos aos tecidos periodontais. De fato, como previamente salientado, a análise fenotípica das células extraídas dos tecidos periodontais mostra que tanto neutrófilos (GR1+) como macrófagos (F4/80+) se encontravam em menor número nos camundongos TNFp55-KO (Fig.16). Ambos os tipos celulares são componentes da resposta imune inata, e diretamente envolvidos no reconhecimento e na morte de patógenos através da produção de fatores antimicrobianos. Em camundongos, os macrófagos são a principal fonte de NO, um radical anti microbiano derivado da arginina e do oxigênio molecular, em uma reação catalizada pela enzima iNOS (BOGDAN *et al.* 2000, BOGDAN 2001, CHAKRAVORTTY & HENSEL 2003). Diversos estudos demonstram que TNF- α é capaz de ativar macrófagos e sua conseqüente ação microbicida via iNOS/NO (LEENEN *et al.* 1994, SOUTO *et al.* 2000, SILVA *et al.* 2003). Nossos resultados demonstram que a expressão de iNOS estava significativamente reduzida nos tecidos periodontais dos animais TNFp55-KO (Fig.23). Por sua vez, neutrófilos também podem ser fonte de NO e outros reativos de oxigênio com função antimicrobiana, como a MPO (CARRERAS *et al.* 1994, ASAI *et al.* 2000). Nossos resultados também demonstram que os níveis de MPO estavam significativamente reduzidos nos tecidos periodontais dos animais TNFp55-KO (Fig.23). Investigando outros possíveis mecanismos de proteção comprometidos pela deficiência no TNFp55, constatamos que o título de IgG total específica para *A. actinomycetemcomitans* estava apenas ligeiramente reduzidos nos animais TNFp55-KO, sugerindo que ausência de TNF- α não prejudica a resposta imune humoral no curso da DP experimental (Fig.23).

Dessa forma, podemos sugerir que tanto MPO como iNOS estão envolvidas no controle da infecção por *A. actinomycetemcomitans*. De acordo tal hipótese, estudos demonstram que iNOS e MPO tem a capacidade de eliminar diversos periodontopatógenos *in vitro* (MIYASAKI *et al.* 1986, MIYASAKI *et al.* 1991, ALLAKER *et al.* 2001, GYURKO *et al.* 2003). Além disso, uma ação complementar entre reativos de nitrogênio e oxigênio tem sido demonstrada, uma vez que animais deficientes tanto de NO como de O_2^- sucumbem rapidamente a infecções com bactérias endógenas (SHILOH *et al.* 1999).

Com relação ao papel de TNF- α na DP experimental, nossos resultados demonstram os mecanismos moleculares envolvidos no controle da reação inflamatória e reabsorção óssea alveolar, e desta forma, na determinação da severidade da doença. Além disso, demonstramos que o TNF- α apresenta um papel importante no controle da infecção periodontal, através de mecanismos que envolvem a quimioatração e ativação de fagócitos nos tecidos periodontais, levando à produção mediadores antimicrobianos.

Além do TNF- α , citocinas como IL-12 e IFN- γ também estão potencialmente envolvidas imunopatogênese das DPs. Tais citocinas são respectivamente a principal indutora,

e a citocina efetora das respostas do tipo Th1, que caracteristicamente potencializam a resposta inflamatória e a imunidade celular. Apesar do papel de tais citocinas nas DP experimental ter sido alvo de estudos prévios, seu papel na patogênese da doença é controverso, no caso do IFN- γ ; e praticamente desconhecido, no caso da IL-12. Além disso, o potencial papel das respostas Th1 no controle da infecção periodontal são completamente inexplorados.

Verificamos inicialmente que os animais geneticamente deficientes de IFN- γ (IFN- γ KO), quando infectados com *A. actinomycetemcomitans*, apresentaram uma significativa diminuição no número de células inflamatórias no tecido gengival; assim como uma redução significativana perda óssea alveolar, quando comparados aos animais WT infectados (Fig. 24 e 25). Ao analisarmos o fenótipo do infiltrado celular presente nos tecidos periodontais dos animais IFN- γ KO, constatamos que o número de neutrófilos, macrófagos, linfócitos T CD4, T CD8 e B se encontrava significativamente reduzido (Fig. 26).

Em concordância com nossos resultados estudos prévios demonstram que camundongos geneticamente deficientes de IFN-γ apresentam uma redução na resposta inflamatória e na reabsorção óssea alveolar em resposta a infecção por *P. gingivalis* (HOURI-HADDAD *et al.* 2002, BAKER *et al.* 1999). Além disso, a ausência de IFN-γ leva a uma menores níveis de inflamação e destruição tecidual na AR (KAGEYAMA *et al.* 1998, BUTLER *et al.* 1999, MAURI *et al.* 2003, VERVOORDELDONK & TAK 2002). Entretanto, um estudo recente demonstra que IFN-γ não apresenta papel crítico na inflamação e na reabsorção óssea periapical (SASAKI *et al.* 2004). Contudo, os mecanismos moleculares pelos quais tal citocina modula a severidade da DP experimental não são conhecidos.

Buscando responder tal questão, nosso primeiro passo foi analisar o papel do IFN-γ na modulação da expressão de citocinas inflamatórias classicamente envolvidas na patogênese das DPs. Nossos resultados demonstram que tanto a expressão de mRNA quanto os níveis de IL-1β e TNF-α se mostraram significativamente menores no tecido gengival de animais IFNγKO (Fig. 27 e 28). Em concordância com tais resultados, estudos demonstram que o IFN-γ induz o aumento de responsividade de fibroblastos gengivais a ação do LPS, levando a uma maior produção de citocinas inflamatórias (TAMAI *et al.* 2002, MOCHIZUKI *et al.* 2004). Além disso, correlações positivas entre os níveis de IFN-γ e mediadores inflamatórios tem sido descritos na DP humana (GORSKA *et al.* 2003); assim como demonstramos tal correlação na DP experimental em camundongos WT (Fig. 10). De fato, a menor expressão de TNF-α e IL-1β na ausência de IFN-γ pode contribuir para a atenuação da severidade da DP experimental (GRAVES *et al.* 1998, DELIMA *et al.* 2001, OATES *et al.* 2002, ORINGER *et al.* 2002, HARRIS *et al.* 2002, VAN DYKE *et al.* 2003).

Além de tais citocinas inflamatórias, as quimiocinas estão diretamente envolvidas na atração seletiva de diferentes populações celulares para os tecidos periodontais (TONETTI *et al.* 1994, MATHUR *et al.* 1996, GAMONAL *et al.* 2001, GEMMEL *et al.* 2001). Assim, nosso próximo passo foi investigar a expressão de tais fatores nos tecidos periodontais dos animais IFN- γ KO. Nossos resultados demonstram que enquanto a expressão de CXCL3 foi similar entre os animais IFN- γ KO e WT infectados, a expressão de CXCL1 e de seu receptor CXCR2 se mostrou significativamente reduzida nos animais IFN- γ KO durante todo o curso da doença (Fig. 30 e 31). De fato, nossos resultados também demonstram que o número de neutrófilos (GR1+) nos tecidos periodontais dos animais TNF-KO se mostrava grandemente reduzido (Fig. 26). Também constatamos que a intensidade de expressão de CCL3 e CCL5, e dos receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR3 estava significativamente diminuída nos animais IFN- γ KO; e que a quimiocina CXCL10 não foi detectada nos tecidos periodontais dos camundongos de tal linhagem (Fig. 30 e 31). Como previamente discutido, tais quimiocinas (CCL3, CCL5 e CXCL10) e seus respectivos receptores (CCR5 e CXCR3) são amplamente expressas em tecidos periodontais humanos doentes (GARLET *et al.* 2003, GAMONAL *et al.* 2001, GEMMEL *et al.* 2001), e estão tipicamente envolvidos na quimioatração de linfócitos Th1 e macrófagos (ROSSI & ZLOTNIK 2000, LUTHER & CYSTER 2001, D'AMBROSIO *et al.* 2003, ROT *et al.* 2004). De fato, nossos resultados demonstram uma dimuição significativa no número de linfócitos CD4, CD8 e macrófagos nos tecidos periodontais dos animais IFN-γKO (Fig. 26).

Em concordância com nossos resultados, diversos estudos demonstram que IFN- γ modula a migração de diversos tipos celulares, incluindo os neutrófilos, macrófagos e células T (SOUTO et al. 2000, ROSSI & ZLOTNIK 2000, ALIBERTI et al. 2001, LUTHER & CYSTER 2001, OBONYO et al. 2002, ZHANG et al. 2003, D'AMBROSIO et al. 2003). A ausência de expressão de CXCL10 nos tecidos periodontais poderia ser reflexo direto da ausência de IFN-y, caracteristicamente envolvido em sua indução (FARBER 1997, NEUMANN et al. 1998, SEBASTIANI et al. 2002, MCLOUGHLIN et al. 2003). Além de induzir a expressão de certas quimiocinas de forma específica (como por exemplo CXCL10), o IFN- γ pode atuar em sinergia com TNF- α na indução da expressão de diversas quimiocinas, como CCL3 e CCL5 (SONG et al. 1999, TALVANI et al. 2000, SEDGWICK et al. 2000, VADAY et al. 2001, OBONYO et al. 2002, BORISH & STEINKE 2003, ZHANG et al. 2003). Desta forma, podemos sugerir que também se verifica um efeito indireto da ausência de IFN- γ , representado pela menor presença de TNF- α nos tecidos periodontais (Fig. 27 e 28), o qual também contribui para a regulação negativa da expressão de quimiocinas. Analisados em conjunto, nossos resultados nos levam a supor que a ausência direta de IFN- γ , somada a menor expressão de citocinas inflamatórias e quimiocinas nos tecidos periodontais, estariam envolvidas na redução na reação inflamatória verificada nos animais IFN-γKO.

Investigando ainda os mecanismos pelos quais o IFN-γ participa da determinação da severidade da DP, nosso próximo passo foi investigar o papel de tal citocina na modulação da expressão de MMPs e TIMPs, RANKL e OPG durante o curso da DP experimental. Nossos

resultados demonstram que os camundongos deficientes de IFN- γ apresentaram uma expressão significativamente reduzida de MMPs, RANKL e catepsina K em todos os tempos analisados, quando comparados aos animais WT (Fig. 32 e 33). Como discutido em relação as quimiocinas, a ausência de IFN- γ somada a menor expressão de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1 β , possivelmente é responsável pela regulação negativa da expressão de MMPs (DAYER & BURGER 1994, BESSIS & BOISSIER 2001, SEBASTIANI *et al.* 2002, MOHAMMED *et al.* 2003, SZEKANECZ *et al.* 2003). Com relação à expressão de RANKL, e studos demonstram que, *in vitro*, o IFN- γ parece inibir a expressão de RANKL, e conseqüentemente, a diferenciação e ativação de osteoclastos (MORIYAMA *et al.* 2002, TAKAYANAGI *et al.* 2002, UDAGAWA *et al.* 2003). Ao contrário, com base em nossos resultados podemos sugerir que *in vivo*, tal efeito inibitório exercido por IFN- γ pode ser suplantado por seu efeito pró-inflamatório. De fato, a ausência de IFN- γ resulta em menores níveis de TNF- α e IL-1 β (Fig. 27 e 28), que caracteristicamente induzem a expressão de RANKL e a diferenciação de osteoclastos.

Por outro lado, a expressão de TIMPs e OPG se mostrou ligeiramente aumentada nos animais IFN-γKO, principalmente na fase inicial da doença, 7 e 15 dias após a inoculação dos microrganismos (Fig. 32 e 33). Tal aumento pode ser resultado da expressão mais precoce e aumentada de IL-10, assim como pelo aumento na expressão de IL-4 nos tecidos periodontais dos animais IFN-γKO (Fig. 27 e 28). Como previamente descrito, durante o curso na DP experimental em camundongos C57BL/6, o início da expressão de IL-4 e IL-10 apresenta uma correlação com aumento da expressão de TIMPs e OPG (Fig. 10). Também de acordo com tais resultados, correlações positivas foram encontradas entre a expressão de IL-4 e IL-10, e a expressão de TIMPs e OPG, estando tal quadro relacionado a menor severidade da DP humana (GARLET *et al.* 2004). De fato, tais citocinas Th2 tem sido descritas como supressoras da atividade de reabsorção óssea, através da regulação positiva da expressão de

OPG (KAWASHIMA & STASHENKO 1999, SASAKI et al. 2000, VAN DEN BERG et al. 2002, MAURI et al. 2003).

Desta forma, sugerimos que o aumento na expressão de mediadores Th2, concomitantemente com a ausência de IFN- γ e menor produção de TNF- α e IL-1 β mediadores nos tecidos periodontais, estaria regulando o balanço da expressão MMPs e TIMPs, e RANKL e OPG, a favor da maior expressão de inibidores, sendo este o mecanismo molecular para a reduzida severidade da DP apresentada pelos animais IFN- γ KO.

Analisando agora o possível papel de IL-12 na imunomodulação da DP experimental, verificamos que os animais geneticamente deficientes de IL-12p40 (IL-12KO) apresentavam apenas uma discreta redução na resposta inflamatória e perda óssea em resposta a infecção por *A. actinomycetemcomitans* quando comparados aos animais WT, porém tal atenuação se mostra geralmente não estatisticamente significativa (Fig. 24 e 25). Além disso, nossos resultados demonstram um padrão de expressão de citocinas inflamatórias e quimiocinas muito parecido nos animais IL-12KO e WT (Fig. 27 a 30). De forma similar, constatamos que os níveis de expressão de MMPs e TIMPS, RANKL e OPG são similares nos camundongos WT e IL-12KO (Fig. 30 e 31). Tais resultados são compatíveis com a discreta redução na resposta inflamatória e na reabsorção óssea (não estatisticamente significantes) vista nos camundongos IL-12KO (Fig. 24) em resposta a infecção por *A. actinomycetemcomitans*.

Apesar de diversos estudos demonstrarem a associação de altos níveis de IL-12, quimiocinas e metaloproteases, em diferentes processos inflamatórios e infecciosos, acreditase que o efeito de tal citocina seja indireto, e mediado principalmente pela produção de IFN- γ , classicamente induzida pela IL-12 (PEEVA *et al.* 2000, KIM *et al.* 2000, HULTGREN *et al.* 2001, HEGEMANN *et al.* 2003, JOOSTEN *et al.* 2002, LAUWERYS *et al.* 2002, FINNEGAN *et al.* 2002). Investigando o motivo da insignificante atenuação da severidade da DP na ausência de IL-12, verificamos que a expressão de IFN- γ se mostrava persistente nos camundongos IL-12KO, apesar de uma redução significativa aos tempos de 1 e 7 dias após a infecção (Fig. 31). De fato, as alterações vistas na expressão de IL-1 β , TNF- α e CXCL10 foram verificadas apenas nesse mesmo período de tempo após a infecção (Fig. 27, 28 e 30).

De acordo com nossos resultados, estudos demonstram o que desenvolvimento de repostas do tipo Th1 e a produção de IFN-γ podem acontecer mesmo na ausência de IL-12, devido a outras citocinas que podem suprir sua ausência (CHIKANO et al. 2000, TRINCHIERI et al. 2003, BROMBACHER et al. 2003, HOLSCHER et al. 2004, NOVELLI et al. 2004). Entre tais citocinas encontra-se a IL-18, detectada tanto nos animais WT como nos IL-12KO durante todo o curso da doença (Fig. 31). De fato, a IL-18 é capaz de induzir a expressão de IFN- γ , além de TNF- α e IL-1 β (PUREN et al. 1998, GRACIE et al. 1999, SWAIN et al. 2001, GRACIE et al. 2003), e apresenta um papel importante na indução e manutenção da resposta inflamatória no curso da AR (VAN DEN BERG et al. 2002, LIEW et al. 2003). Como previamente discutido, uma vez que a AR compartilha diversos aspectos com as DPs (MERCADO 2003) um papel similar poderia ser exercido pela IL-18 na patogênese das DPs (DELALEU et al. 2004). De fato, parece existir uma redundância no papel de tais citocinas, uma vez que a ausência de IL-12 ou IL-18 não altera a reabsorção óssea periapical (SASAKI et al. 2004). Contudo, estudos demonstram que IL-18 pode apresentar um papel dúbio como polarizadora da resposta imune, levando a respostas Th1 ou Th2, na dependência do microambiente local (NAKANISHI et al. 2001). Outra citocina que poderia induzir a expressão de IFN-y é a IL-23, uma citocina da família da IL-12 recentemente caracterizada (TRINCHIERI et al. 2003, BROMBACHER et al. 2003, NOVELLI et al. 2004, HOLSCHER et al. 2004). Estudos recentes sugerem que o papel de IL-23 na patogênese da artrite é mais relevante que o da própria IL-12, originalmente reconhecida como principal responsável pela geração de células Th1 em tal patologia (ANDERSSON et al. 2004). Assim como a IL-18, a IL-23 é detectada tanto nos tecidos periodontais dos animais WT como nos IL-12KO durante todo o curso da doença (Fig. 31). Até o presente momento, acreditamos que essa seja a primeira descrição da expressão de tais citocinas nos tecidos periodontais.

Desta forma, os resultados até aqui apresentados, demonstram que a IL-12 parece não apresentar um papel crítico na patogênese da doença, sendo que sua clássica função de indutora da produção de IFN-γ pode estar sendo realizada por citocinas como a IL-18 e a IL-23. Além disso, demonstramos que a ausência de IFN-γ resulta em menor severidade da DP, através da regulação da expressão de quimiocinas e citocinas, assim como de MMPs e RANKL.

Contudo, a ausência de IFN- γ resulta na perda da imunidade protetora à infecção por *A. actinomycetemcomitans*, uma vez que 100% dos animais geneticamente deficientes de IFN- γ morreram entre 42 a 55 dias de infecção (Fig. 34). Aos 45 dias de infecção, detectamos a presença de *A. actinomycetemcomitans* nos tecidos periodontais, estômago, intestino, pulmão, fígado, coração, rim e baço dos camundongos IFN- γ KO. A análise histopatológica de tais órgãos demonstrou alterações significativas apenas nos pulmões desses animais, nos quais se verificava a presença de intenso infiltrado inflamatório e regiões de fibrose, o que não acontecia nos animais controle (Fig. 35) e em nenhuma das demais linhagens estudadas (dados não mostrados). Além disso, os camundongos IFN- γ KO infectados com *A. actinomycetemcomitans* apresentaram um significativo aumento na resposta de fase aguda (Fig. 36), assim como uma redução no ganho de peso durante o curso da infecção (Fig. 36). Ao contrário, nos animais WT e IL-12KO (Fig. 34) a detecção de *A. actinomycetemcomitans* se manteve restrita aos tecidos periodontais, estômago, intestino, sendo que a resposta de fase aguda e o ganho de peso de tais animais é similar ao visto nos animais controle (Fig. 36).

Em concordância com nossos resultados, antes de ser reconhecido como periodontopatógeno (TANNER *et al.* 1979), o *A. actinomycetemcomitans* era descrito em lesões cardíacas, pulmonares, cerebrais, urinárias; sendo alvo de diversos estudos nesse

Discussão 139

sentido (OVERHOLT *et al.* 1966, MARTIN *et al.* 1967, TOWNSEND *et al.* 1969, MUHLE *et al.* 1979). Atualmente, devido as possíveis influências sistêmicas da infecção periodontal, tal assunto voltou a ser foco de grande interesse, e diversos estudos tem demonstrado a presença de periodontopatógenos em ateromas, lesões pulmonares e cerebrais, entre outras (ZIJLSTRA *et al.* 1992, MORRIS *et al.* 1994, CHEN *et al.* 1995, STELZEL *et al.* 2002, ISHIHARA *et al.* 2004, KORDES *et al.* 2004, PATUREL *et al.* 2004). Além disso, estudos demonstram que o clone de *A. actinomycetemcomitans* utilizado em nossos estudos, o JP2, é caracterizado pela intensa atividade leucotóxica e pela grande capacidade de invasão tecidual (HENDERSON *et al.* 2002, HAUBEK *et al.* 2004, HAUBEK *et al.* 2004B).

Além da disseminação de *A. actinomycetemcomitans* em diversos órgãos, nossos resultados demonstram que a carga bacteriana presente nos tecidos periodontais dos camundongos IFN- γ KO era significativamente maior do que nos animais WT (Fig. 34 e 36), enquanto que nos animais IL-12KO apenas um pequeno aumento foi detectado 7 dias após a inoculação dos microrganismos (Fig. 34 e 36). De fato, a geração de respostas do tipo Th1 tem sido descrita com imprescindível no controle de uma série de patógenos, uma vez que a ausência de IFN- γ leva ao aumento da suscetibilidade a uma ampla gama de infecções, causadas por bactérias, vírus e outros parasitas (LE PAGE *et al.* 2000, XING *et al.* 2000, DECKER *et al.* 2002, SALAZAR-MATHER & HOKENESS 2003, TRINCHIERI *et al.* 2003).

Uma hipótese para a ineficiente resposta dos animais IFN- γ KO à infecção por *A*. *actinomycetemcomitans*, é que a reduzida expressão de quimiocinas no tecido gengival (Fig. 30 e 31) poderia estaria prejudicando o recrutamento de fagócitos, dificultando ou impossibilitando a resposta imune local. Nesse sentido, demonstramos que o número de neutrófilos e macrófagos estava bastante reduzido nos tecidos periodontais dos animais IFN- γ KO, quando comparado aos animais WT (Fig. 26). Como previamente discutido, ambos os tipos celulares participam da resposta imune inata e estão diretamente envolvidos no controle de microrganismos através da produção de mediadores antimicrobianos. De fato, verificamos que a expressão de iNOS estava significativamente reduzida no tecido gengival dos animais IFN- γ KO (Fig. 37), assim como visto nos animais TNFp55KO (Fig.23). Tais resultados sugerem que iNOS pode apresentar um papel importante no controle da infecção periodontal. De fato, ao infectarmos animais iNOS-KO com *A. actinomycetemcomitans*, verificamos um grande aumento na carga bacteriana nos tecidos periodontais, assim como um aumento na resposta de fase aguda, e uma redução no ganho de peso por tais animais durante o curso da doença (Fig. 38). De fato, como previamente descrito, o sistema iNOS/NO apresenta importante papel microbicida frete a inúmeros patógenos, entre os quais estão incluídos *P. gingivalis* e o *A. actinomycetemcomitans* (VAN DER VEEN *et al.* 2001, SILVA *et al.* 2003, GYURKO *et al.* 2003). No entanto, não foram verificadas mortes, assim como não foram detectados indícios de disseminação bacteriana nos animais iNOS-KO infectados com *A. actinomycetemcomitans* (dados não mostrado).

Desta forma, tais resultados nos levam a supor que apesar de iNOS apresentar um papel importante no controle da infecção periodontal, outros fatores antimicrobianos provavelmente estariam envolvidos neste processo. De fato, também constatamos uma drástica redução na atividade de MPO nos tecidos periodontais dos animais IFN- γ KO, comparados aos animais WT. Em concordância com nossos resultados, estudos demonstram que o IFN- γ apresenta um papel importante na ativação de neutrófilos, o que contribui de maneira significativa para sua atividade antimicrobiana (SHALABY *et al.* 1985, RUBIN *et al.* 1989, MORRISON *et al.* 1987, ELLIS *et al.* 2004, MARTINELLI *et al.* 2004). Investigando outros mecanismos imunes que poderiam estar prejudicados pela ausência de IFN- γ , constatamos que os títulos de anticorpos contra *A. actinomycetemcomitans* eram similares nos animais IFN- γ KO, IL-12KO e WT.

Uma vez que tanto os animais IFN-yKO, TNFp55-KO e iNOS-KO apresentaram um aumento na susceptibilidade a infecção por A. actinomycetemcomitans, mas apenas o IFNyKO apresentou mortalidade à infecção, comparamos a presença de fagócitos e de mediadores antimicrobianos nos tecidos periodontais de tais animais durante o curso da infecção. Nossos resultados demonstram que o número de neutrófilos, assim como os níveis de MPO nos tecidos periodontais verificados na ausência de IFN-γ são significativamente menores que aqueles vistos nos camundongos TNFp55-KO (Fig. 15, 23, 26 e 37). Ao contrário, nossos resultados demonstram que os níveis de expressão de iNOS, assim como o número de macrófagos tecidos periodontais dos camundongos infectados Α. nos com actinomycetemcomitans são similares entre animais IFN-γKO e TNFp55-KO (Fig. 15, 23, 26 e 37). Desta forma, nosso resultados nos levam a supor que a produção de mediadores antimicrobianos por neutrófilos (entre os quais se encontra a MPO) parece exercer um papel crítico no controle da infecção experimental por A. actinomycetemcomitans. Nossos resultados também sugerem que a enzima iNOS, supostamente envolvida na produção de NO, também contribui para o controle da infecção, mas não apresenta um papel tão decisivo como a MPO.

Em resumo, tais resultados demonstram o papel essencial de IFN- γ na determinação de uma imunidade protetora contra a infecção por *A. actinomycetemcomitans*. Tal proteção parece ser exercida por mecanismos que incluem a quimioatração de fagócitos e sua conseqüente ativação, levando a produção de mediadores antimicrobianos nos tecidos periodontais. Um dado interessante se refere às diferenças de resposta dos animais IFN- γ KO frente a infecção por diferentes periodontopatógenos. Nossos resultados demonstram que animais IFN- γ KO infectados com *P. gingivalis*, apesar de apresentarem uma maior carga bacteriana nos tecidos periodontais e maior resposta de fase aguda do que os animais WT, não apresentam mortalidade durante o curso da infecção (Fig. 34 e 36). Tal resultado sugere que a interação de um hospedeiro suscetível e/ou imunocomprometido com periodontopatógenos específicos pode ser crítica para a determinação dos efeitos sistêmicos das DPs.

Nossos dados demonstram que a resposta imune e inflamatória parece ser de fundamental importância para o controle da infecção periodontal, porém, resulta na destruição dos tecidos caracteristicamente associada a esta patologia. Supõe-se que mecanismos regulatórios possam controlar, ou ao menos atenuar os efeitos deletérios decorrentes de tal resposta, sem comprometer o controle da infecção. De fato, no curso da DP experimental em camundongos C57BL/6, demonstramos que a expressão de IL-4 e IL-10 estava relacionada a uma menor progressão da doença (Fig. 1, 4 e 5), e ao que parece, não estava relacionada com alterações dos níveis de infecção dos tecidos periodontais por *A. actinomycetemcomitans* (Fig.11). Nesse sentido, nosso próximo passo foi investigar o papel de IL-4 e IL-10 na modulação da severidade das DPs, assim como os mecanismos envolvidos em tal processo.

Avaliamos inicialmente os parâmetros de severidade da DP, reação inflamatória e reabsorção óssea alveolar na DP experimental em camundongos geneticamente deficientes de IL-4 ou IL-10. Nossos resultados demonstraram que os camundongos IL-4KO e IL-10KO infectados com *A. actinomycetemcomitans* apresentaram aumento no número de leucócitos nos tecidos periodontais e nos níveis de reabsorção óssea, quando comparados aos animais WT, principalmente na fase tardia da doença, após 30 dias de infecção (Fig. 39 e 40). Constatamos também que o número de macrófagos, linfócitos T CD 4 e T CD8 se mostrava aumentado nos camundongos IL-4KO e IL-10KO, enquanto o número de neutrófilos e linfócitos B era similar ao visto nos tecidos periodontais dos animais WT (Fig.41). De fato, como previamente demonstrado, nos animais WT, uma intensa expressão de IL-4 e IL-10 é detectada após 30 dias de infecção (Fig. 4 e 5). De acordo com nossos resultados, estudos prévios demonstram que a ausência de IL-4 ou IL-10 leva tanto ao aumento da resposta inflamatória como a maiores índices de reabsorção óssea (OWENS *et al.* 1996,

KAWASHIMA et al. 1999, SASAKI et al. 2000, CUZZOCREA et al. 2001, BENDIXEN et al. 2001, AL-RASHEED et al. 2004, SAIDENBERG-KERMANAC'H et al. 2004, SASAKI et al. 2004).

Contudo, os mecanismos envolvidos no controle da resposta inflamatória pelas citocinas Th2 na DP experimental não são conhecidos. Nesse sentido, analisamos inicialmente a expressão dos mediadores classicamente associados à patogênese da DP, IL-1 β e TNF- α , além de IFN-γ. Nossos resultados demonstraram um significativo aumento nos níveis de IL-1 β , TNF- α e IFN- γ no tecido gengival de animais IL-4KO e IL-10KO infectados com A. actinomycetemcomitans, principalmente após 30 dias de infecção (Fig. 42 e 43). Além do aumento da expressão de citocinas inflamatórias, verificamos que a expressão de CXCL1, CCL3, CCL5, CXCL10, e dos receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR3 estava significativamente aumentada nos animais IL-4 e IL-10KO (Fig. 44 e 45). Desta forma, o aumento na intensidade de expressão de citocinas inflamatórias e quimiocinas estaria diretamente envolvido no aumento na reação inflamatória verificado na ausência de IL-4 ou IL-10. De fato, estudos demonstram que tanto IL-4 como IL-10 são capazes de inibir a produção de citocinas inflamatórias, que por sua vez induzem a produção de quimiocinas (DONNELLY et al. 1990, TE VELDE et al. 1990, FIORENTINO et al. 1991, HAMILTON et al. 1999, COCCIA et al. 2000, SHANLEY et al. 2000, BRODBECK et al. 2002, KITAURA et al. 2003). Por outro lado, constatamos que a expressão de CCL1 e de CCR4, ligados a respostas do tipo Th2, estava reduzida nos animais IL-4KO, enquanto nos animais IL-10KO tal expressão foi similar àquela vista nos animais WT (Fig. 44 e 45). De fato, estudos demonstram que IL-4 induz a expresssão de quimiocinas como CCL1 e CCL22, e o conseqüente recrutamento de células Th2 expressando CCR4 e CCR8 (ROSSI & ZLOTNIK 2000, LUTHER & CYSTER 2001, D'AMBROSIO et al. 2003, ROT et al. 2004). De acordo com tais resultados, verificamos que a expressão a IL-4 durante o curso da doenca é similar entre os animais IL-10KO e WT (Fig. 42 e 43). Ao contrário, constatamos que na ausência de IL-4, a expressão de IL-10 durante o curso da DP experimental se mostra significativamente reduzida (Fig. 44 e 45).

Além da modulação da expressão de quimiocinas, IL-4 e IL-10 estão potencialmente envolvidas na regulação do balanço entre MMPs, RANKL e seus respectivos inibidores. Investigando tal possibilidade, verificamos que a expressão de MMPs e RANKL, e catepsina K, estava significativamente aumentada nos animais IL-4 e IL-10KO quando comparados aos animais WT (Fig. 46 e 47). Além disso, nossos resultados também demonstram uma significativaredução dos níveis de expressão de TIMPs e OPG na ausência de IL-4 ou IL-10 (Fig. 46 e 47). Em concordância com nossos dados, estudos demonstram que as propriedades regulatórias tanto de IL-4 como de IL-10 incluem o estímulo a produção de TIMPs e OPG, e a inibição direta da expressão de MMPs e RANKL (MERTZ *et al.* 1994, REYNOLDS *et al.* 1996, BESSIS *et al.* 2001, CHAKRABORTI *et al.* 2003, CHENG *et al.* 2003, VISSE *et al.* 2003, BAKER *et al.* 2002, SAIDENBERG-KERMANAC'H *et al.* 2004, KWAN TAT *et al.* 2004). Além disso, podemos supor que a dimuição da expressão de citocinas inflamatórias vista em tais animais contribui para a menor expressão de MMPs e RANKL.

Em conjunto, tais resultados sugerem que uma ação sinérgica de IL-4 e IL-10 leva a atenuação da severidade da DP experimental, através do controle da expressão de citocinas inflamatórias, quimiocinas, e mediadores envolvidos na destruição dos tecidos periodontais. Tal mecanismo explicaria a ação favorável das citocinas Th2 no que diz respeito à atenuação da severidade da doença. Entretanto, ao compararmos ambas linhagens de animais geneticamente modificados, constatamos que a ausência de IL-4 resulta em uma doença mais severa do que a falta de IL-10 (Fig. 39). De fato, como previamente citado, verificamos que o aumento na expressão de IL-10 constatado durante o curso da doença é dependente de IL-4; enquanto a expressão de IL-4 parece ser independente de IL-10 (Fig.42 e 43). Também

verificamos que a expressão de CCL1 e CCR4 era menor nos tecidos periodontais dos animais IL-4KO, enquanto a ausência de IL-10 parece não interferir em tal expressão (Fig.44 e 45). Tais resultados nos levam a supor que IL-4 induz o aumento da produção de IL-10 por outras células do infiltrado microambiente periodontal, como fibroblastos ou macrófagos. Além disso, IL-4 parece induzir a expressão de CCL1, que por sua vez leva ao recrutamento de células expressando CCR4, as quais também poderiam ser fonte de IL-10.

Uma população celular que potencialmente estaria envolvida em tal processo corresponde às células T CD4+CD25+ com fenótipo regulatório, chamadas comumente de células T regulatórias ou Tregs. Diversos estudos têm demonstrado o papel das células T regulatórias CD4+CD25+ na supressão e regulação da resposta imune em condições de inflamação e infecção, prevenindo ou atenuando efeitos deletérios de respostas exageradas, como dano tecidual ou até mesmo a morte (SINGH *et al.* 2001, CUROTTO DE LAFAILLE *et al.* 2002, MCGUIRK *et al.* 2002, BAECHER-ALLAN *et al.* 2004). Uma vez ativadas, sua função supressora é antígeno inespecífica, levando a supressão da proliferação de outras células T, ou ainda bloqueando ou diminuindo a produção de mediadores inflamatórios por tais células (CUROTTO DE LAFAILLE *et al.* 2002, BAECHER *et al.* 2002, BAICHER-ALLAN *et al.* 2004, SAKAGUCHI *et al.* 2004, EHRENSTEIN *et al.* 2004). Embora haja controvérsia quanto a seus mecanismos de ação, acredita-se que possa exercer suas funções de maneira dependente do contato célula-célula através da molécula inibitória CTLA-4, ou através da produção de citocinas, como TGF- β e IL-10 (CUROTTO DE LAFAILLE *et al.* 2002, BAICHER-ALLAN *et al.* 2002, BAICHER-ALLAN *et al.* 2004).

Além da modulação da resposta inflamatória, a produção de citocinas pelas células CD4+CD25+, marcadamente IL-10, é determinante da manutenção do estado de latência em diferentes infecções, facilitando a sobrevida dos patógenos e possibilitando a reativação da doença (BELKAID *et al.* 2002, SAKAGUCHI 2004, MITTRUCKER *et al.* 2004, ABE *et al.*

2004). Investigando uma possível interferência de IL-10 no controle da infecção experimental por *A. actinomycetemcomitans*, verificamos que a carga bacteriana nos tecidos periodontais dos animais IL-10KO era similar àquela vista nos animais WT durante todo o curso da infecção (Fig. 48). Além disso, não foram encontradas diferenças entre a reposta de fase aguda e o ganho de peso durante o curso da infecção nos animais IL-10KO e WT (Fig. 48). Ao analisarmos os níveis de mediadores antimicrobianos nos tecidos periodontais dos animais IL-10KO, constatamos também um aumento na expressão de iNOS a partir de 15 dias após a inoculação dos microrganismos, e maiores níveis de atividade de MPO aos 60 dias de infecção (Fig. 49). Nossos resultados também demonstram que os níveis de anticorpos específicos para *A. actinomycetemcomitans* são similares nos animais IL-10KO e WT (Fig. 49). Em concordância com tais resultados, um estudo recente demonstra que a IL-10 não interfere na imunidade protetora a infecção por *P. gingivalis* (SASAKI *et al.* 2004). Dessa forma, podemos concluir que IL-10 apresenta um importante papel anti inflamatório ligado a atenuação da severidade da DP, e que tal citocina não parece interferir no controle da infecção periodontal.

Ao contrário, IL-4 parece apresentar um papel protetor contra a infecção periodontal. Nossos resultados demonstram que a carga bacteriana no tecido periodontal, assim como a resposta de fase aguda apresentada pelos animais IL-4KO durante o curso da infecção, eram maiores do que nos camundongos WT (Fig. 48). Porém, não foram constatadas alterações significativas no ganho de peso apresentado pelos animais IL-4KO infectados com *A. actinomycetemcomitans* durante o curso da infecção (Fig. 48). Ao analisarmos os níveis de mediadores antimicrobianos produzidos pelos animais IL-4KO em resposta a infecção por *A. actinomycetemcomitans*, constatamos que os níveis de MPO eram similares aos dos animais WT em todos os tempos analisados (Fig. 49), e que a expressão de iNOS nos tecidos periodontais dos animais IL-4KO se encontrava aumentada na fase tardia da infecção (Fig. 49). Ao contrário, na ausência de IL-4 os níveis de anticorpos específicos para A. actinomycetemcomitans no soro dos animais ainda estavam presentes em níveis detectáveis, porém significativamente reduzidos quando comparados aos verificados nos animais WT (Fig. 49). De acordo com tais resultados, estudos demonstram que citocinas como a IL-13 podem compensar a ausência de IL-4 na indução de respostas Th2 (CORRY et al. 2002, IZUHARA et al. 2002, HERSHEY et al. 2003, WYNN et al. 2003). Uma vez que IL-13 também é detectada nos tecidos peridontais inflamados, tal citocina poderia de certa forma compensar, pelo menos parcialmente, a ausência de IL-4 na indução da produção de anticorpos (YAMAZAKI et al. 1997, ROBERTS et al. 1997). Estudos demonstram que nas DPs a produção de anticorpos acontece tanto de forma sistêmica como local, tendo em vista o elevado número de células B presentes nas lesões periodontais. Independentemente de serem induzidas por IL-4 ou IL-13, respostas do tipo Th2 potencializam a produção de anticorpos, os quais, além de atuarem diretamente na neutralização de toxinas bacterianas, podem potencializar a resposta imune celular através da opsonização e potencialização da fagocitose (WYNN et al. 2003, EBERSOLE et al. 2003). De fato, estudos demonstram que a produção de anticorpos específicos para patógenos periodontais apresenta papel protetor contra a infecção periodontal, além de estar relacionada a atenuação da severidade da doença (BEHLING et al. 1981, CLARK et al. 1991, PERSSON et al. 1994, GIBSON FC 3RD et al. 2003).

Em conjunto, nossos resultados sugerem que ambas citocinas Th2, IL-4 e IL-10 estão envolvidas no controle da severidade da DP, modulando a resposta inflamatória e a reabsorção óssea alveolar; e que IL-4 contribui significativamente para o controle da infecção periodontal, através da potencialização da produção de anticorpos. Ao contrário, nossos resultados sugerem que IL-10 aparentemente não possui papel crítico no controle da infecção periodontal. Acreditamos que nossos estudos contribuem de forma significativa no conhecimento dos mecanismos envolvidos na destruição tecidual característica das DPs, demonstrando o papel de TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-4 e IL-10 na modulação da expressão de mediadores inflamatórios e quimiocinas, e na migração celular para os tecidos periodontais. Além disso, demonstramos o papel de tais citocinas na modulação da expressão de metaloproteases, RANKL e seus respectivos inibidores. Também demonstramos a participação de tais fatores no controle da infecção experimental por *A. actinomycetemcomitans*, e na modulação das conseqüências sistêmicas da DP experimental.

Com freqüência nos referimos à atenuação da severidade da DP como proteção. Mas essa proteção, com relação à perda de inserção peridontal, também confere ao paciente proteção frente à infecção bacteriana? Nossos resultados demonstram que os camundongos C57BL/6 apresentam uma intensa resposta de fase aguda, mas a infecção aparentemente é restrita aos tecidos periodontais, sem outras alterações sistêmicas evidentes. Entretanto, as possíveis conseqüências de tal infecção necessitam ser investigadas com maiores detalhes e em longo prazo. Dessa forma, a resposta imune e inflamatória, normalmente considerada "vilã" na patogênese da doença periodontal, começa a ter sua "culpa" reavaliada, uma vez que diversos estudos tem demonstrado sua importância no controle da infecção periodontal.

De fato, apesar da menor severidade da DP vista nos animais TNFp-55KO e IFN- γ KO, a ausência de tais fatores resulta em maiores níveis de infecção, e até mesmo a disseminação dos microorganimos e morte dos animais foram constatadas. Contudo, devemos ter cuidado ao extrapolar para o dia a dia da clínica resultados obtidos com um modelo experimental no qual um hospedeiro altamente imunodeficiente (como os camundongos IFN- γ KO) recebem a inoculação de altas doses de um periodontopatógeno extremamente virulento (como a cepa JP2 de *A. actinomycetemcomitans*). Entretanto, tais resultados nos levam a pensar que, uma vez que ainda não compreendemos realmente qual o nível de proteção conferido pela resposta imune e inflamatória gerada em resposta a periodontopatógenos, devemos agir com prudência ao interferir em tal processo. Talvez a melhor estratégia seja intervir em mecanismos que possam controlar o dano aos tecidos periodontais, mas que não impossibilitem a resposta do hospedeiro frente a um foco infeccioso crônico, no qual inúmeros microrganismos potencialmente patogênicos (também do ponto de vista sistêmico) estejam presentes. Por outro lado, a presença de mediadores anti-inflamatórios, como a IL-10, contribui para a atenuação da severidade da doença e parece não comprometer o controle da infecção periodontal, sugerindo que o potencial uso de tal fator para intervenção imunoterapêutica nas DPs se mostra, pelo menos à primeira vista, promisssor.

Apesar de todo o conhecimento acumulado a respeito da patogênese das doenças periodontais, acreditamos que apenas a ponta do iceberg foi identificada. Questões relativamente simples, tais como quais células são responsáveis pela produção de cada citocina, ainda precisam ser respondidas. Além disso, não se sabe como acontece a modulação da resposta do hospedeiro frente a diferentes periodontopatógenos, e principalmente, a infecções mistas? Até que ponto a influência genética pode influenciar o estabelecimento e o curso da doença?

Acreditamos que o conhecimento a respeito do papel das citocinas da imunopatogênese das DPs, esclarecendo os mecanismos envolvidos na determinação do dano tecidual e no controle da infecção periodontal servirão de base para o direcionamento de estratégias de prevenção das DPs, bem como para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para tais doenças.

Discussão 150



Figura 51 – Participação de citocinas na imunomodulação da doença periodontal experimental induzida por Actinobacillus actinomycetemcomitans. Baseado em nossos resultados, este modelo esquematiza os mecanismos pelos quais as citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-4 e IL-10 participam da modulação da severidade da doença periodontal experimental, e do controle da infecção por *A.actinomycetemcomitans*. *AA – A.actinomycetemcomitans*; Ab – anticorpos; CRP – proteína C reativa; MMPs – metaloproteases; TIMPs – inibidores de metaloproteases; OPG – osteoprotegerina; PMN – neutrófilos polimorfonucleares; Mø – macrófagos; Th – linfócito T helper; B – linfócito B; MPO – mieloperoxidase.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. As citocinas desempenham importantes papéis da imunopatogenese da DP experimental, estando envolvidas tanto na determinação do dano tecidual como no controle da infecção periodontal por *A. actinomycetemcomitans*, e dessa forma, constituem um alvo em potencial para desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico, terapia e prevenção das DPs.

2. Durante o curso da doença periodontal experimental, a resposta imune se mostra inicialmente polarizada para o fenótipo Th1, com alta expressão de TNF- α , IFN- γ , quimiocinas e receptores de quimiocinas do tipo Th1, MMPs e RANKL, estando associada a uma intensa migração celular e reabsorção óssea. Após 30 dias de infecção, verificamos a ocorrência de uma resposta imune mista, com expressão de mediadores dos padrões Th1, e Th2: IL-4, IL-10, CCL-1 e CCR4. Tal resposta está associada com o aumento na expressão de TIMPs e OPG, e a atenuação da progressão da DP.

3. A ausência de TNFp55 está associada à regulação negativa da expressão de quimiocinas e receptores de quimiocina do tipo Th1, MMPs e RANKL, e a diminuição da resposta inflamatória e na reabsorção óssea alveolar durante o curso da doença periodontal experimental. Além disso, a deficiência em TNFp55 interfere na resposta imune protetora à infecção por *A. actinomycetemcomitans*, caracterizada pelo aumento da carga bacteriana nos tecidos periodontais, maior resposta de fase aguda e redução no ganho de peso durante o curso da infecção. Tal comprometimento está associado a menor quimioatração de neutrófilos e macrófagos para os tecidos periodontais, e a menores níveis de iNOS e MPO.

4. A ausência de IFN- γ está ligada a regulação negativa da expressão de citocinas inflamatórias, quimiocinas e receptores de quimiocina do tipo Th1, MMPs e RANKL, e a diminuição da resposta inflamatória e na reabsorção óssea alveolar durante o curso da doença periodontal experimental. Além disso, a deficiência em IFN- γ leva ao comprometimento da resposta imune protetora à infecção por *A. actinomycetemcomitans*, caracterizada pelo aumento da carga bacteriana nos tecidos periodontais, maior resposta de fase aguda e redução no ganho de peso durante o curso da infecção. Tal comprometimento está associado a menor quimioatração de neutrófilos e macrófagos para os tecidos periodontais, e a menores níveis de iNOS e MPO.

5. A IL-12 não parece apresentar um papel crítico na patogênese da doença periodontal experimental, uma vez que a resposta inflamatória, a reabsorção óssea alveolar, e a carga bacteriana nos tecidos periodontais dos animais IL-12KO é similar àquela vista nos animais WT. A expressão de citocinas como IL-18 e IL-23 pode suplantar a ausência de IL-12 como indutora da produção de IFN-γ.

6. A ausência de IL-4 e IL-10 está associada ao aumento da expressão de citocinas inflamatórias, quimiocinas e receptores de quimiocina do tipo Th1, MMPs e RANKL, e no aumento da resposta inflamatória e na reabsorção óssea alveolar durante o curso da doença periodontal experimental. Concluímos também que a IL-10 não interfere no controle da infecção periodontal, uma vez a carga bacteriana e resposta de fase aguda apresentada pelos animais IL-10KO é similar àquela vista nos animais WT. Ao contrário, a ausência de IL-4 leva a uma menor produção de anticorpos específicos para *A. actinomycetemcomitans*, e está ligada ao aumento da carga bacteriana nos tecidos periodontais e a uma maior intensidade da resposta de fase aguda.

RESUMO & ABSTRACT

The providence of the second states of the second states and the

7. RESUMO

Acredita-se que a resposta imune e inflamatória proteja o hospedeiro contra a infecção periodontal, mas tal resposta resulta na destruição dos tecidos periodontais. Neste estudo, examinamos os mecanismos pelos quais as citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-4 e IL-10 modulam o curso da doença periodontal (DP) experimental. Camundongos C57BL/6 infectados com A. actinomycetemcomitans JP2 desenvolvem uma intensa reação inflamatória e severa reabsorção óssea alveolar, associada a altos níveis de TNF- α e IFN- γ nos tecidos periodontais. Tal padrão de resposta está associado com a intensa expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas do tipo Th1, MMPs, RANKL e a rápida progressão da doença. Após 30 dias de infecção, mediadores de respostas do tipo Th2 (IL-4, IL-10, CCL1, CCR4) também podem ser detectados nos tecidos periodontais, e estão associados a uma intensa expressão de TIMPs e OPG, e a atenuação da progressão da doença. De fato, a ausência de TNFp55 ou IFN-γ resulta na redução da expressão de citocinas inflamatórias, quimiocinas, MMPs e RANKL, estando associada a uma menor migração celular para os tecidos periodontais e a menor reabsorção óssea alveolar. Entretanto, animais TNFp55-KO e IFNyKO apresentam uma maior susceptibilidade a infecção por A. actinomycetemcomitans, caracterizada pelo aumento na carga bacteriana nos tecidos periodontais, menores níveis de iNOS e MPO, aumento da resposta de fase aguda e menor ganho de peso durante o curso da infecção. Além disso, a deficência de IFN-γ resulta em uma infecção disseminada e na morte de 100% dos animais. A doença periodontal nos animais IL-12KO infectados com A. actinomycetemcomitans é similar a observada nos animais WT em todos os parâmetros analisados. Ao contrário, nos tecidos periodontais de camundongos geneticamente deficientes de IL-4 ou IL-10 são encontrados maiores níveis de citocinas e quimiocinas do tipo Th1, além de uma menor expressão de TIMPs e OPG, levando ao aumento da severidade da doença. Enquanto IL-10 não parece exercer um papel crítico no controle dos microrganimos, a produção de anticorpos dependente de IL-4 parece contribuir de forma significativa para o controle da infecção. Nossos dados sugerem que TNF- α e IFN- γ levam ao aumento da migração celular e da reabsorção óssea alveolar, enquanto contribuem marcadamente para o controle da infecção por A. actinomycetemcomitans. Nossos resultados também sugerem que IL-10 leva a atenuação da severidade da doença, mas não compromete o controle da infecção; enquanto a IL-4 contribui tanto para o controle dos microrganismos como para a menor severidade da DP experimental.

8. ABSTRACT

Inflammatory immune reactions in response to periodontopathogens are thought to protect the host against infection, but they may trigger periodontal destruction. Here, we examined the mechanisms by which the cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-4 and IL-10 modulate the outcome of periodontal disease (PD). Mice infected with Actinobacillus actinomycetemcomitans JP2 develop PD, with a severe inflammatory reaction and bone resorption, associated with high levels of TNF- α and IFN- γ in periodontal tissues of mice. Such pattern of cytokine expression was clearly associated with high levels of Th1-type chemokines and chemokine receptors, MMPs, RANKL and a high disease progression. After day 30 post infection, a Th2 type pattern of cytokine and chemokine expression was found (IL-4, IL-10, CCL1, CCR4) to be associated with the higher expression of TIMPs and OPG, and with the attenuation of disease progression. We also demonstrated that the deficiency of TNF-p55 or IFN- γ resulted in a reduced expression of Th1-type chemokines, low cell infiltrated, lower levels of MMPs and RANKL, driving to a less severe disease. Moreover, the absence of TNF- α or IFN- γ results in high susceptibility to A. actinomycetemcomitans infection, characterized by increased bacterial load in gingival tissue, lower levels of iNOS and MPO in periodontal tissues, higher levels of C-reactive protein in liver and serum, and significant decrease in weight gain compared to WT mice. Furthermore, absence of IFN- γ resulted in disseminated A. actinomycetemcomitans infection, and 100% of mortality. The periodontal disease in IL-12KO is similar to that seem in WT mice in all the parameters evaluated. On the contrary, mice deficient of IL-4 and IL-10 presented increased expression of Th1 type chemokines and cytokines, decreased expression of TIMPs and OPG, leading to an enhanced inflammatory reaction and bone loss. However, while IL-10 does not present a critical role in the control of experimental AA infection, antibody production driven by IL-4 seems to participate in the control of the bacteria. Our data suggests that TNF- α and IFN- γ drive enhanced bone resorption whereas protect the host from A. actinomycetemcomitans infection. Our results also suggests that IL-10 contributed to attenuate the tissue destruction and does not compromise the control of infection and. In addition, IL-4 contributes both to the control of infection and to attenuate disease severity.

ANEXOS

The second second second stand to the second s



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO "CAMPUS" DE RIBEIRÃO PRETO TELEFONE: PABX 602.3000 - FAX: (0XX16) 633.1586 14049-900 - RIBEIRÃO PRETO - ESTADO DE SÃO PAULO

Interessado(a): GUSTAVO POMPERMAIER GARLET Orientador(a): Prof. Dr. JOÃO SATANA DA SILVA Assunto: Avaliação do projeto de pesquisa: "Estudo do papel do IFN-γ, TNF-α, IL-4 e iNOS na imunomodulação da doença periodontal induzida em camundongos".

INFORMAÇÃO

O projeto intitulado "Estudo do papel do IFN- γ , TNF- α , IL-4 e iNOS na imunomodulação da doença periodontal induzida em camundongos", foi analisado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em sua 15^a Reunião Ordinária, realizada em 26 de julho de 2004, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Protocolo N° 019/2004.

Ribeirão Preto, 29 de julho de 2004. Profa. Dra. LUIZA DA SILVA LOPES Vice-Presidente, em exercício, da Comissão de Ética em Experimentação Animal



Anexo 03 – Análise da curva de dissociação para determinação da especificidade da reação de amplificação através de RealTimePCR. A especificidade da reação de amplificação foi analisada através da curva de dissociação, comparando os picos obtidos da dissociação do produto amplificado à temperatura de Melting (TM) do fragmento de amplificação esperado (nesse exemplo, TM CCR5=83°C). A figura demonstra os resultados obitidos pela dissociação de 3 amostras nas quais diferentes concentrações de primers (sense e antisense) para CCR5 foram utilizadas (A1: $0,4\mu$ g; A2: $0,2\mu$ g; A3: $0,1\mu$ 3; todas com a mesma concentração de cDNA, de uma mesma amostra), e de um controle negativo (A3: $0,1\mu$ + água). Podemos observar a gradativa redução dos produtos inespecíficos (identificados como os picos nas temperaturas de 67°C e 74°C), e a detecção do produto específico (identificado pelo pico na temperatura de 83°C) com a diminuição da concentração de primer na reação.



Anexo 04 – Análise quantitativa da expressão de mRNA através de RealTimePCR. O sistema utilizado realiza as reações de amplificação e detecção, e quantifica as amostras (o termociclador ABI5700, associado ao Software ABI Prism, Applied Biosystems) através da análise do nível de fluorescência gerado pela incorporação nucleases fluorogênicas (SYBRGreen 1) aos produtos de amplificação durante o curso da reação. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cicle threshold – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos aonde a amplificação das amostras, atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. A figura demonstra os resultados obitidos para a amplificação de 4 amostras (A1-4) e de um controle negativo (A5); exemplificando as fases de amplificação, a deteminação de Ct, assim como os valores de Ct de cada uma das amostras.



13 Although the pathogenesis of periodontal disease (PD) is not well known, cytokines, chemotactic factors and inflammatory cells are 14 certainly involved in the disease outcome. Here, we characterized the evolution of the PD induced by Actinobacillus actinomycetencomitans 15 in mice, showing that oral inoculation of these bacteria leads to the migration of leukocytes to periodontal tissues and marked alveolar bone resorption. We found the expression of pro-inflammatory and Th1-type cytokines including TNF- α , IFN- γ and IL-12 in periodontal tissues 16 17 after infection with A. actinomycetencomitans, from the early stages after infection and throughout the course of the disease. Similar kinetics 18 of expression were found for the chemokines CCL5, CCL4, CCL3 and CXCL10 and for the receptors CCR5 and CXCR3, all of them linked 19 to the Th1-type pattern. The expression of the Th2-type mediators IL-10, CCL1 and their receptors CCR4 and CCR8 was detected only after 30 days of infection, determining a time-dependent mixed pattern of polarized immune response. The chemokine expression was correlated 20 21 with the presence of polymorphonuclear leukocytes, macrophages, CD4 and CD8 lymphocytes, and B cells in the inflammatory infiltrate. 22 Interestingly, during the predominance of the Th1-type response, a sharp increase in the number of inflammatory cells and intense bone loss 23 was seen. By contrast, after the increased expression of Th2-type mediators, the number of inflammatory cells remained constant. Our data 24 demonstrate that mice subjected to oral inoculation of A. actinomycetemcomitans represent a useful model for the study of PD. In addition, 25 our results suggest that expression of cytokines and chemokines can drive the selective recruitment of leukocyte subsets to periodontal tissues, which could determine the stable or progressive nature of the lesion. 26

27 © 2005 Elsevier SAS. All rights reserved.

28 Keywords: Experimental periodontal disease; Actinobacillus actinomycetemcomitans; Cytokines; Chemokines; Chemokine receptors; Cell migration;
 29 Inflammation
 30

31 1. Introduction

Periodontal disease (PD), a chronic inflammatory disease
of the attachment structures of the teeth, is one of the most
significant causes of tooth loss in adults and the most preva-

lent form of bone pathology in humans, besides being a modi-35 fying factor of the systemic health of patients. The bacterial 36 biofilm attached to the surface of the tooth in close associa-37 tion with periodontal tissues, is the etiologic factor of this 38 disease. The biofilm hosts some typical periodontopatho-39 gens, such as Actinobacillus actinomycetemcomitans, one of 40 the main etiological agents of localized aggressive human 41 periodontitis and of a large number of cases of chronic peri-42 odontitis [1]. The virulence factors of this pathogen include 43 leucotoxins, immunosuppressive factors, and a high capacity 44 to invade the host cells [2-4]. In vitro, A. actinomycetemcomi-45 tans induces the expression of several cytokines and chemok-46

Abbreviations: PD, periodontal disease; pi, post infection; PMN, polymorphonuclear leukocyte; RPA, RNAse protection assay; Th, T helper lymphocyte.

^{*} Corresponding author. Tel.: +55 16 602 3234; fax: +55 16 633 6840. *E-mail address:* jsdsilva@fmrp.usp.br (J.S. Silva).

^{1286-4579/\$ -} see front matter $\mbox{\sc C}$ 2005 Elsevier SAS. All rights reserved. doi:10.1016/j.micinf.2005.01.012

ARTICLE IN PRESS

G.P. Garlet et al. / Microbes and Infection (2005)

47 ines by different cell types [5,6], which are possibly involved48 in mediating the migration of leukocytes to the affected tis-49 sue.

50 Indeed, the development of PD seems to be related to the 51 extension of the inflammatory cell infiltrate to the deeper peri-52 odontal tissues [7]. Polymorphonuclear leukocytes (PMNs), 53 the first cell type found in PD lesions, appear to provide the 54 primary immune protection [8,9]. When the aggressive stimu-55 lus is not eliminated, it may lead to chronic PD, character-56 ized by a cellular infiltrate dominated by mononuclear cells. 57 Macrophages are outnumbered in chronic inflammatory 58 lesions of PD and are thought to participate in the local 59 immune response through presentation of antigen, killing of 60 pathogens and production of inflammatory mediators [10,11]. Regarding lymphocytes, whereas T lymphocytes predomi-61 62 nate in the established chronic lesion, the proportion of B 63 cells and plasma cells increases with the progression of the 64 disease [11–13].

65 This host response to periodontopathogens protects against the infection, but the persistence of pathogens and the exac-66 67 erbated immune response may render the protective roles of 68 inflammatory cells dangerous to the host tissues. Inasmuch 69 as the chemotactic factors produced in the lesions certainly 70 are involved in the pathogenesis of PD, their identification is 71 fundamental to guide the development of strategies for con-72 trolling the disease.

73 Chemokines, a family of chemotactic cytokines, attract leu-74 kocyte populations by means of their interaction with spe-75 cific receptors that are members of the seven-transmembrane 76 spanning G protein-coupled receptor family, selectively expressed in these cells [14]. Besides their chemoattractant 77 activity, chemokines also are implicated in the polarization 78 79 of the immune response, in leukocyte activation, and in the 80 pathogenesis of several diseases [15,16]. Some chemokines 81 have been found in diseased human periodontal tissues 82 [17–20], but their role in the pathogenesis of PD remains unknown. We detected Th1-type chemokines and chemokine 83 84 receptors in gingival biopsies of patients with aggressive peri-85 odontitis, and their expression may favor the migration of the 86 IFN- γ -producing cells found in the lesions. Conversely, in 87 chronic periodontitis there was predominance in the expres-88 sion of Th2 chemokines, which correlated with the higher expression of IL-10 [20]. Therefore, the selective chemoat-89 90 traction of T helper (Th) subsets could influence the clinical 91 outcome of PD. In fact, the polarization of immune responses 92 can determine the prognosis of several diseases [21-23], such 93 as arthritis, that share several features with PD, such as the 94 chronic nature of the inflammatory reaction with concomi-95 tant bone resorption [24].

96 The role of chemokines and cytokines in the orchestration 97 of cellular traffic to periodontal tissues is not known, and data 98 are lacking regarding the relevance and kinetics of their 99 expression in the course of human PD. In addition, variables 100 such as the different compositions of periodontal biofilm, the 101 age at onset of disease and the genetic variability of hosts 102 may hinder the interpretation of human studies. Consequently, experimental mouse models are useful to study PD,103since they present several advantages including multiple104strains with known genetic background, ease of handling,105availability of experimental reagents, and the susceptibility106to induction of PD [25–27].107

Therefore, our aim was to characterize a mouse model of108PD induced by A. actinomycetemcomitans. We investigated109the expression patterns of chemokines, chemokine receptors110and cytokines mRNA, and the kinetics of cell migration and111alveolar bone loss throughout the course of experimental PD.112We conclude that this murine model could be useful for test-113ing hypotheses relevant to human PD.114

2. Materials and methods

115

128

151

Experimental groups comprised 8-week-old male 117 C57BL/6 mice, bred and maintained in the animal facilities 118 of the Department of Biochemistry and Immunology, School 119 120 of Medicine of Ribeirão Preto-USP. Throughout the period of the study mice were fed with sterile standard solid mice 121 chow (Nuvital, Curitiba, PR), and sterile water. Mice colo-122 123 nies were free from the following periodontopathogens: A. 124 actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, Prevo-125 tella intermedia, Fusobacterium nucleatum, Eikenella cor-126 rodens. The experimental protocol was approved by the local Institutional Committee for Animal Care and Use. 127

2.2. Induction of PD/periodontal infection

129 A. actinomycetemcomitans (ATCC 29522) was grown anaerobically in supplemented agar medium (TSBV) as pre-130 viously described [28]. Initially the animals received a direct 131 injection of 1×10^9 CFU of a diluted culture in 10 µl of PBS 132 into the palatal gingival tissue of the second molar. Immedi-133 ately after, 1×10^9 CFU of a diluted culture in 100 µl of PBS 134 with 2% of carboxymethylcellulose (used to facilitate the 135 retention of the bacterial suspension in the oral cavity) was 136 placed in the oral cavity with a micropipette; and after 48 and 137 96 h only this procedure was repeated. This protocol repre-138 sents the combination of the number of bacteria and the num-139 ber of inoculations effective in promoting the colonization of 140 141 the oral cavity by A. actinomycetemcomitans and the establishment of PD in 100% of the animals. The effectiveness of 142 infection was confirmed by the detection of A. actinomycet-143 emcomitans in periodontal tissues by polymerase chain reac-144 tion (PCR) (as previously described [28]) at all the times ana-145 lyzed. Positive controls received a single injection of LPS 146 (5 µg in 10 µl of PBS—E. coli LPS—Sigma Co., St. Louis, 147 148 MO). Negative controls included sham-infected mice, which received PBS with carboxymethylcellulose solution without 149 A. actinomycetemcomitans, and non-infected animals. 150

2.3. RNA extraction

Total RNA was extracted from gingival palatal tissues152between the mesial of the first molar and the distal site of the153

2
G.P. Garlet et al. / Microbes and Infection (2005)

third molar. This was performed with the Trizol reagent fol-154 lowing the protocol recommended by the manufacturer (Life 155 156 Technologies, Rockville, MD). Briefly, Trizol (1 ml for 1 mg of tissue) was added to the sample, shaken for 30 s and incu-157 158 bated at room temperature for 5 min. For each 1 ml of the suspension 0.2 ml of chloroform (Sigma Co.) was added and 159 160 centrifuged at $12,000 \times g$ for 15 min at 4 °C. The aqueous phase was transferred to a new tube, to which the same vol-161 162 ume of isopropanol was added. The sample was shaken, incubated for 20 min at -20 °C and centrifuged again as previ-163 164 ously described. The precipitate was washed in 100% ethanol 165 and dried at room temperature. RNA samples were sus-166 pended in 50 µl of deionized RNAse free water and stored at -70 °C. An aliquot of 5 µl was used to obtain the concentra-167 168 tion of RNA per ul in the samples, using the GeneQuant kit 169 (Pharmacia Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

170 2.4. RNAse protection assay (RPA)

171 Total RNA was extracted as previously described. RPA 172 was performed with multiprobe template mCK-5-containing 173 DNA templates for the chemokines: XCL-1 (lymphotactin/ 174 LTN), CCL5 (RANTES), CCL11 (eotaxin), CCL3 (MIP-175 1α), CCL4 (MIP-1 β), CXCL1 (MIP-2), CCL2 (JE), and the housekeeping genes L32 and GAPDH following the manu-176 177 facturer's protocol (BD Biosciences PharMingen, San Diego, 178 CA). Briefly, the DNA template was used to synthesize the 179 α -[³²P]UTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham Life Sci-180 ence, Buckinghamshire, UK) labeled probes in the presence 181 of a GACU pool using a T7 RNA polymerase. Hybridization with 20 µg of each target RNA was performed overnight fol-182 lowed by digestion with RNAse A and T1. The samples were 183 184 treated with a mixture of proteinase K-SDS and then extracted 185 with chloroform and precipitated by the addition of ammo-186 nium acetate. The samples were loaded on an acrylamide-187 urea sequencing gel next to DNA molecular weight markers and labeled probes, and run at 50 W with Tris-borate/ethylene-188 189 diaminetetraacetic acid (EDTA) electrophoresis buffer (TBE). 190 The gel was adsorbed onto a filter paper and dried under vacuum. The radioactivity of $[\alpha^{-32}P]$ -labeled probes was mea-191

Table 1

sured by phosphorimaging (STORM Phosphorimaging, BD192Biosciences PharMingen), used to visualize the results. Since193only the samples were submitted to proteinase digestion, they194are visualized in different positions to the DNA molecular195weight markers in the gel. At each time point, two animals196per group were individually analyzed.197

2.5. RT-PCR reactions 198

The complementary DNA (cDNA) was synthesized by 199 means of a reverse transcription reaction (Superscript II, 200 Gibco-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) using 3 µg of 201 RNA. PCRs were them performed in a final volume of 50 µl 202 containing 2.5 mM MgCl₂, 2.5 U of the enzyme Taq poly-203 merase (Gibco-Life Technologies), and specific primers at 204 1 µM by using the PTC-100 cycler (MJ Research, Water-205 town, MA). The basic conditions of the reaction were 206 30 cycles of 1 min at 94 °C for denaturation, 1 min at 54 °C 207annealing and 2 min at 72 °C of extension, plus a final step of 208 extension for 7 min at 72 °C. The sequences of the primers 209 used are given in Table 1. The detection of mRNA for beta 210 actin was used as a positive control, while a water sample 211 was used as a negative control. The amplification products of 212 PCR were separated by electrophoresis on a 6% acrylamide 213 gel and visualized as bands by 0.2% silver nitrate staining. At 214 each time point, three animals per group were individually 215 216 analyzed.

2.6. Histological analysis 217

Four animals selected at random from each group were 218 219 sacrificed at 0, 15, 30, and 60 days after infection. The periodontal tissues obtained were then fixed in 4% paraformal-220 dehyde in PBS at pH 7.4 for 12 h at room temperature. The 221 specimens were demineralized thoroughly in 10% EDTA 222 disodium salt for 1-2 weeks. The decalcified mouse periodon-223 tal tissues were trimmed, dehydrated in graded ethanol and 224 embedded in paraffin. Serial sections (5 µm) were cut and 225 mounted on glass slides precoated with 0.1% poly-L-lysine 226 (Sigma Co.). Histological assessment was carried out follow-227 ing routine hematoxylin and eosin staining. 228

Primers sequences	and reaction properties		
Target	Sense and anti-sense sequences	tA ^a (°C)	bp ^b
IFN-γ	GCT CTG AGA CAA TGA ACG CT AAA GAG ATA ATC TGG CTC TGC	60	229
IL-12	CCA CAT TCC TAC TTC TC GTC TAT TCC GTT GTG TC	58	205
TNF-α	AAG CCT GTA GCC CAT GTT GT CAG ATA GAT GGG CTC ATA CC	58	255
IL-10	CAA TAA CTG CAC CCA CTT CCC GAG AAA TCG ATG ACA GCG CCT	58	310
IL-4	TAT GCG AAG CAC CTT GGA AGC CTG ACG GCA CAG AGC TAT TGA	56	251
CXCL3	CC TTG ACC CTG AAG CTC CCT TGG TTC CGTGCG TGT TGA CCA TAC AAT ATG	58	521
CXCL10	CA GCACCATGAA CCCAAGTGC GGT CTTCTGAAAG GTGACCAGC	58	431
CXCR3	ATC TACCTATCAG CCAACTACGA T CAGAGAGCAA ATGTGGATGT	60	433
CCR5	CTC TTC CTG CTC ACA CTA CCA T TGT GTA GAA AAT GAG GAC TGC A	60	322
CCR4	CTT GCACCAAGGA AGGTAT AG CATAGACAGA TACCTAGG	60	334
CCR8	TGTCCACGCTGTCTATGCCAT CAGACCCAAGGCGTTGATTT	58	217
β-Actin	TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG A TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG T	60	349

^a tA: annealing temperature.

^b bp: base pairs of amplicon size.

3

4

ARTICLE IN PRESS

G.P. Garlet et al. / Microbes and Infection (2005)

229 2.7. Isolation of inflammatory cells from periodontal230 tissues and flow cytometric analysis

231 To isolate and characterize leukocytes present in the lesion 232 site, whole buccal and palatal periodontal tissues of upper 233 molars were collected and incubated for 1 h at 37 °C, dermal side down on RPMI 1640, supplemented with NaHCO₃, 234 235 penicillin/streptomycin/gentamycin, and 0.28 Wunsch 236 units/ml of liberase blendzyme CI (Roche-F. Hoffmann-La 237 Roche Ltd, Basel, Switzerland). The tissues of five mice at 238 each time point per group were processed in the presence of 239 0.05% DNase (Sigma-Aldrich, Steinhein, Germany) using 240 Medimachine (BD Biosciences PharMingen) according to the 241 manufacturer's instructions. After processing, cell viability 242 was assessed by Trypan blue exclusion, and the cell count 243 was performed in a Neubauer chamber. For immunofluores-244 cence staining, after cell count, the cells were filtered through a 50-µm filter and then were washed and stained for 20 min 245 at 4 °C with the optimal dilution of each Ab. For immunostain-246 ing, PE- and FITC-conjugated Abs against CD4, CD8, 247 248 GR1 and F4/80, and respective isotype controls were em-249 ployed (BD Biosciences PharMingen). Cells were washed 250 again and analyzed by flow cytometry (FACScan[™] and CELLQuestTM software; BD Biosciences PharMingen). 251 Results represent the number of cells (±S.D.) in the peri-2.52 253 odontal tissues of each mouse, for three independent experi-254 ments.

255 2.8. Quantification of alveolar bone loss

256 Evaluation of the extent of alveolar bone loss was per-257 formed similarly as previously described [25]. The maxillae 258 were hemisected, exposed overnight in 3% hydrogen peroxide and mechanically defleshed. The palatal faces of the 259 molars were photographed with 20× magnification using a 260 261 dissecting microscope (Leica, Wetzlar, Germany), with the 262 occlusal face of the molars positioned perpendicularly to the base. The images were digitized, and analyzed by an investi-263 gator unfamiliar with the project, using ImageTool 2.0 soft-264 265 ware (The University of Texas Health Science Center, San 266 Antonio). Quantitative analysis comprised the measurement 267 of the area between the cemento-enamel junction (CEJ) and 268 the alveolar bone crest (ABC), in arbitrary units of area 269 (AUA), corresponding to the pixels contained in the selected area in the three posterior teeth. At each time point, five ani-270 271 mals were analyzed, and for each animal the alveolar bone loss was defined as the average of CEJ-ABC between the 272 273 right and the left arch.

274 2.9. Statistical analysis

The inflammatory cells number and the CEJ–ABC area values were submitted to the one-way ANOVA statistical test, followed by Tukey's post test. Differences in the relative intensity of mRNA expression between the groups were analyzed by the Kruskal–Wallis test and Dunn's post test. Values of P < 0.05 were considered statistically significant. All statis-
tical tests were performed with the Graph Pad InStat 3.05 and
Graph Pad Prism 3.0 software (Graph Pad Software Inc., San
Diego, CA).280
281

3. Results

3.1. Kinetics of the expression of messenger RNA for
cytokines as measured by RT-PCR285
286

284

287 Since the cytokine pattern in periodontal tissue is supposed to determine the outcome of human PD, we therefore 288 evaluated the kinetics of expression for mRNA for the cytok-289 ines TNF-α, IFN-γ, IL-12, IL-10 and IL-4 by RT-PCR (Fig. 1) 290 throughout the course of experimental PD. Infected mice 291 exhibited messages for TNF- α , IFN- γ and IL-12 during all of 292 the period analyzed, and these were detected as early as 6 h 293 pi. IL-10 mRNA was only detected at 30 days post infection 294 and was maintained until 60 days, while message for IL-4 was 295 not detected (Fig. 1A). As a positive control, we injected LPS 296 into gingival tissue and evaluated the expression of message 297 for the same cytokines. LPS induced the expression of TNF- α 298 and IFN- γ at 6, 24, 48 h and 3 days pi, while IL-10 and 299 IL-4 mRNA were not detected at these time points (Fig. 1B). 300 Sham-infected and control groups showed no expression of 301 mRNA for these cytokines. The expression of the housekeep-302 ing gene β -actin is also shown (Fig. 1. line 6). 303

3.2. Kinetics of chemokines mRNA expression as measured 304 *by RPA* 305

Our next aim was to evaluate the kinetics and the pattern 306 of expression of chemokines in the course of the disease. We 307 performed RPA in order to determine the kinetics of the quantitative expression of mRNAs for the chemokines XCL1, 309



Fig. 1. Kinetics of cytokines mRNA expression in the course of experimental PD. Periodontal tissues of C57BL/6 mice inoculated orally with *A. actinomycetemcomitans* (A) or LPS (B) were harvested from zero (before infection) until 60 days of infection. The RNA was isolated and the transcripts for the cytokines IFN- γ , IL-12, TNF- α , IL-10, and IL-4 were detected by RT-PCR, as described in Section 2. The results shown are representative of three independent experiments.

G.P. Garlet et al. / Microbes and Infection (2005)



Fig. 2. Kinetics of chemokines mRNA expression in the course of experimental PD. Periodontal tissues of C57BL/6 mice inoculated orally with *A. actinomy-cetemcomitans* (A) or LPS (B) was analyzed for chemokine expression by RNA protection assay. Total RNA of periodontal tissues was isolated from zero to 60 days after infection or LPS injection and the expression of chemokines was determined as described in Section 2. The results shown are representative of two independent experiments.

310 CCL5, CCL11, CCL4, CCL3, CXCL1, CCL2 and CCL1 in 311 gingival tissues of mice from all experimental groups.

312 CXCL1 was the first chemokine to be detected, starting 6 h after initial inoculation and increasing its level of expression 313 after 24 h. The expression of CXCL1 was maintained until 314 315 60 days pi. The messages for CCL3, CCL4, CCL5, and 316 CCL11 were also detected 12 h after infection. Expression of 317 these mediators was found to be increased 24 h pi, and was 318 present throughout the period of observation. The kinetics of expression of mRNA for CCL1 were different from those of 319 all other chemokines analyzed, being detected only 15 days 320 after infection. No messages for XCL1 and CCL2 chemok-321 ines were detected throughout the period analyzed (Fig. 2A). 322 323 The injection of LPS in the palatal gingival tissue induced 324 messages for CCL5, CCL11, CCL4, CCL3 and CXCL1 after 325 6 h, with the expression peaking at 24 h. Infected mice only weakly expressed these chemokines from 24 h up to 3 days 326 327 (Fig. 2B) pi. Injection of LPS did not induce expression of the chemokines XCL1, CCL2 and CCL1. No messages for 328 any of the chemokines analyzed in this present work were 329 330 detected in sham-infected and control groups (data not shown). The expression of the housekeeping genes L32 and 331 332 GAPDH is also shown (Fig. 2).

333 3.3. Kinetics of chemokines and chemokine receptors334 mRNA expression

We next evaluated the expression of the chemokines CXCL3 and CXCL10, and chemokine receptors in periodontal tissues by means of RT-PCR. CXCL3 was strongly expressed from 6 to 48 h pi. Message for CXCL10 was detected from 24 h up to 30 days after infection (Fig. 3A).

After injection of LPS expression of CXCL3 and 340 CXCL10 was also observed at 6, 24 h, 3 and 7 days after LPS 341 injection (Fig. 3B). RT-PCR reactions for XCL1, CCL5, 342 CCL11, CCL4, CCL3, CXCL1 and CCL1 confirmed the data 343 obtained by RPA (data not shown). No messages for the ana-344 lyzed chemokines were detected in sham-infected and con-345 trol groups (data not shown). The expression of the chemok-346 ine receptors CXCR3, CCR5, CCR4 and CCR8 was also 347 evaluated after infection with A. actinomycetemcomitans. 348 Messenger RNA for CXCR3 and CCR5 was detected after 349 48 h pi, persisting through the entire period of observation. 350 Infected mice expressed CCR4 and CCR8 mRNA at a later 351



Fig. 3. Kinetics of CXCL3, CXCL10, and chemokine receptors mRNA expression in the course of experimental PD. Periodontal tissues of C57BL/6 mice inoculated orally with *A. actinomycetemcomitans* (A) or LPS (B) were harvested from zero (before infection) until 60 days of infection. The RNA was isolated and the transcripts for CXCL3, CXCL10, CXCR3, CCR5, CCR4, and CCR8 were detected by RT-PCR as described in Section 2. The results shown are representative of three independent experiments.

G.P. Garlet et al. / Microbes and Infection (2005)



Fig. 4. Histological sections of periodontal tissues of *A. actinomycetemcomitans* infected mice. Periodontal tissue samples of C57BL/6 mice inoculated orally with *A. actinomycetemcomitans* were taken before (C) and at 15 (15 days), 30 (30 days) and 60 (60 days) days after infection. The periodontal tissues were fixed in paraformaldehyde, demineralized in EDTA solution, and embedded in paraffin. Serial sections (5 µm) were cut and histological assessment was carried out following routine hematoxylin and eosin staining. Magnification, ×200.

352 time point, 30 and 60 days after the first inoculation (Fig. 3A).

353 The expression of CXCR3 and CCR5 in the gingival tissue 354 of mice that received LPS was observed, respectively, at

355 24 and 48 h, while the expression of CCR4 and CCR8 was

356 not detected at any time point. Messages for the chemokine

357 receptors analyzed were not detected in sham-infected and

358 control groups (data not shown). The expression of the house-

359 keeping gene β -actin is also shown (Fig. 3).

360 3.4. Inflammatory infiltrate in periodontal tissues

A significant inflammatory cell infiltrate was found in the 361 connective tissue proximal to the junctional epithelium and 362 363 surrounding bone tissue of mice inoculated with A. actino-364 mycetemcomitans, extending to all the gingival tissue surrounding the molars (Fig. 4). Inflammatory cells were found 365 366 to have infiltrated periodontal tissues at 15 days post initial inoculation and such cell migration became more evident at 367 368 30 and 60 days post infection. Proliferation of the cells that comprise the junctional epithelium was also seen, appearing 369 370 on day 15, and persisting up to 60 days post infection. In fact, the infected mice presented a significant increase in the num-371 372 ber of leukocytes extracted from periodontal tissues at 15 days (P < 0.05), 30 days (P < 0.05) and 60 days (P < 0.01) post 373 initial inoculation, when compared with sham-infected and 374 non-infected mice (Fig. 5A). By FACS, we determined that 375 376 PMNs were the predominant cell type in periodontal tissues 24 h pi, reaching a peak at 7 days post infection. These cells 377 were still found in substantial numbers until day 60 pi 378 (Fig. 5B). After day 15 pi, there was a shift towards a pre-379 380 dominance of mononuclear cells, comprising CD4⁺ (Fig. 5C) 381 and CD8⁺ T cells (Fig. 5D), and F4/80⁺ cells (Fig. 5E). This

infiltrate remained constant until day 60 days pi. In addition,	382
the number of B cells was significantly increased ($P < 0.05$)	383
at day 30 and 60 pi (Fig. 5F).	384

3.5. Analysis of the alveolar bone resorption 385

We finally evaluated the alveolar bone level, in order to 386 establish the effectiveness of experimentally-induced PD. 387 While sham-infected and non-infected mice did not present 388 alveolar bone loss in the analyzed period (Fig. 6), mice that 389 received oral inoculation of A. actinomycetemcomitans pre-390 sented an evident horizontal bone loss (Fig. 6A), verified by 391 the increase in the area between the CEJ and the ABC at days 392 30 (P < 0.05) and 60 (P < 0.01) pi (Fig. 6B). Besides the hori-393 zontal bone loss, we also identified infra-bone lesions in the 394 proximal faces, as well as lesions in the inter radicular area 395 of increasing severity in the first and third molars, 30 and 396 60 days pi (indicated by arrows in Fig. 6A). 397

4. Discussion

In the present study we showed that mice submitted to oral 399 inoculation with A. actinomycetemcomitans developed PD, 400 characterized by expression of mRNA for several cytokines, 401 chemokines, and chemokine receptors in the gingival tissues, 402 migration of lymphocytes, macrophages and PMN cells to 403 periodontal tissues, besides marked bone resorption. Some 404405 advantages of this model are that the PD is induced by a known periodontopathogen, the time of infection is precise, 406 and there is no requirement for silk ligatures, allowing the 407 study of the effects of the microorganism without the inter-408

398

G.P. Garlet et al. / Microbes and Infection (2005)

С Е Α 30 p<0.001 150 75 p<0.001 vs 0h p<0.001 vs 0h CD3 + CD4 + cells (x10³) Leukocytes (x10⁵) F4/80 + cells (x103) 20 100 50 infected 10 50 25 sham-infected control 0 0 0 30 45 60 15 0h 24h 7d 15d 30d 60d 0h 24h 7d 15d 30d 60d days post infection days post infection days post infection в D F 150 40 75 p<0.001 vs 0h p<0.001 vs 0h * p<0.001 vs 0h CD3 + CD8 + cells (x10³) CD19 + cells (x10³) Gr1 + cells (x102) 30 50 100 20 50 25 10 0 C C Oh 7d 15d 7d 15d 30d 24h 7d 15d 30d 24h 30d 60d 0h 24h 60d Oh 60d days post infection days post infection days post infection

Fig. 5. Phenotypic analysis of the inflammatory cells harvested from *A. actinomycetemcomitans* infected periodontal tissues. C57BL/6 mice were inoculated orally with *A. actinomycetemcomitans*, tissue samples were taken, and the leukocytes isolated from the inflammatory infiltrate as described in Section 2. The cell viability was assessed by Trypan blue exclusion and the (A) total leukocytes counted in a Neubauer chamber. For immunofluorescence staining, PE- and FITC-conjugated Abs specific to GR1, CD4, CD8, F4/80, CD19, and respective control isotypes were employed and analyzed by flow cytometry. The values (mean + S.D.) obtained from three animals at each time point are shown, from two independent experiments. P < 0.001, Mann–Whitney test.

409 ference of mechanical trauma to the tissues. In fact, the oral

410 inoculation results in effective colonization of mouse tissues

411 by A. actinomycetemcomitans, which is detected by PCR in

412 periodontal tissues throughout the course of the disease (data

413 not shown) [28]. 414 During the course of the infection we consistently detected 415 in periodontal tissues of mice messages for the pro-416 inflammatory and Th1-type cytokines $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$ and

417 IL-12 [21,22,29,30]. In addition, starting at 30 days post infec-418 tion, we detected the expression of IL-10 mRNA, an anti-

419 inflammatory cytokine involved in Th2 responses [31]. IL-4,420 a key cytokine in the induction of Th2 responses [32,33], was

421 not detected, possibly due to the short-half life and instability

of its mRNA [34]. In spite of some conflicting data on the 422 role of Th1 and Th2 cytokines in PD, they have been associ-423 ated, respectively, with activation and suppression of disease 424 activity [30,35–37]. The development of such sequential pat-425 terns of cytokine expression was previously reported in 426 response to inoculation of LPS in periodontal tissues of mice 427 [38], although their relevance to cell migration and to the 428 429 severity of disease outcome was not established.

The first messages for chemokines detected in periodontal 430 tissues of infected mice were for CXCL1 and CXCL3, both 431 involved in the chemoattraction of PMNs [14,39–41]. These 432 chemokines are the murine analogues of human IL-8, which 433 is widely expressed in diseased periodontal tissues [17,18]. 434



Fig. 6. Alveolar bone loss in *A. actinomycetemcomitans* infected mice. C57BL/6 mice were inoculated orally with *A. actinomycetemcomitans*, periodontal samples were taken and the alveolar bone level was evaluated. A) Maxillar palatal aspect of alveolar bone loss in *A. actinomycetemcomitans* infected mice. The much greater loss of alveolar bone at 30 and 60 days after infection compared with non-infected mice (C) is evident and indicated by arrows. The maxillas depicted were chosen from mice representative of the respective group. B) Alveolar bone loss quantification was performed through the measurements of CEJ–ABC area in the palatal face of maxillary molars, with ImageToll2.0 software. Values (mean + S.D.) obtained from five animals at each time point, from three independent experiments. *P < 0.05, **P < 0.01, one-way ANOVA, Bonferroni post test.

8

G.P. Garlet et al. / Microbes and Infection (2005)

The expression of CXCL3 was detected only until 48 h post 435 436 infection while CXCL1 was found at all the time points stud-437 ied up until 60 days. Accordingly, we found GR1-positive 438 cells at all the time points investigated, as occurs in the acute 439 inflammatory reaction and even in the chronic stages of PD 440 [11,12]. PMNs are thought to play important roles in the 441 pathogenesis of PD, since either hypo or hyper activity of 442 this cell type is associated with severe forms of PD [8,42,43]. 443 The expression of CCL3, CCL4 and CCL5, its receptor 444 CCR5, as well as CXCL10 and its receptor, CXCR3, was 445 also found during all the course of disease. Expression of 446 these chemokines and receptors correlated with the presence 447 of macrophages and CD4 and CD8 lymphocytes. Indeed, mac-448 rophages express CCR5, whereas CD4 and CD8 T lympho-449 cytes express CCR5 and/or CXCR3 [14,44,45]. Such cells, 450 chemokines and chemokine receptors are commonly found 451 in diseased periodontal tissues [11,18,20,46], and are known 452 to be involved in Th1-type diseases, such as multiple sclero-453 sis and rheumatoid arthritis [44,47–49]. In fact, rheumatoid 454 arthritis shares several features with PD, including the chronic 455 nature of the inflammatory reaction and bone resorption activ-456 ity [24]. We also detected in diseased periodontal tissue the 457 expression of the chemokines and chemokine receptors 458 closely associated with Th2 responses. CXCL11 and CCL1, 459 which are detected, respectively, after 24 h and 15 days post 460 inoculation are involved in the chemoattraction of 461 eosinophils/basophils and of Th2 lymphocytes [14,50]. In 462 accordance, the messages for CCR4 and CCR8, both ex-463 pressed by Th2 cells [14,44,50–52], are expressed only after 464 day 30 pi. These results suggest that the production of different cytokines and chemokines in the diseased periodontal tis-465 sues leads to a migration of distinct T helper subsets in the 466 course of experimental PD. Moreover, the pattern of immune 467 response found in mice infected with A. actinomycetemcomi-468 469 tans evolves from Th1 to a mixed Th1/Th2 pattern.

470 The initial occurrence of a Th1 response may be induced 471 by A. actinomycetemcomitans, a potent inducer of IL-12 and 472 IFN- γ in vitro [53,54]. This initial Th1 response could be sus-473 tained and amplified by the expression of CCL3, CCL4, CCL5 and CXCL10, which attracts CCR5⁺ and CXCR3⁺ 474 475 cells, including Th1 lymphocytes and macrophages [14,47]. 476 Macrophages, found in large numbers in inflamed gingival 477 tissues, are thought to play a significant role in the killing of 478 pathogens and in the release of pro-inflammatory mediators, 479 such as TNF- α , IL-1 and nitric oxide [11,29,55,56]. These 480 mediators also enhance the cellular immune response, which 481 may be useful in controlling invasive pathogens, such as A. 482 actinomycetemcomitans. On the other hand, the inflamma-483 tory products widely produced by macrophages are known to 484 induce bone resorption by promoting the differentiation and 485 maturation of osteoclasts [29,56]. In this way, the chemoat-486 traction of macrophages may contribute towards the mainte-487 nance of the chronic inflammatory reaction and the tissue 488 destruction seen in PD. Additionally, the chemoattraction of 489 IFN-γ-producing Th1 cells, classically involved in the acti-490 vation of macrophages [57–59], could also contribute to disease progression. This possibility is compatible with the evi-491dence that the adoptive transfer of Th1 cells results in alveolar492bone resorption in mice [35].493

Following the course of PD in mice, our results showed 494 the expression of CCL1, a known attractant of cells that 495 express CCR4 or CCR8, which can include Th2-type cells 496 and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells [13,14,44,50–52,60]. The 497 Th2-type cytokines in the lesion may enhance the humoral 498 immune response, which in turn may contribute to the con-499 trol of periodontopathogens in the gingival crevice and in peri-500odontal tissues. In fact, we found a significant increase in the 501 number of B cells in periodontal tissues 30 days after the 502 infection, a finding supported by studies showing accumula-503 tion of B lymphocytes in chronic periodontal lesions in 504 humans [11]. Additionally, Th2 cells, which produce the anti-505 inflammatory cytokines IL-4, IL-10 and IL-13, are associ-506 ated with suppression of bone resorption [31,37,61,62]. 507 Indeed, the adoptive transfer of cells with a Th2 phenotype to 508 nude rats attenuates the severity of PD [36]. A further poten-509 tial source of IL-10, a cytokine detected in periodontal tis-510 sues 30 days post infection, could be a CD4⁺CD25⁺ T cell 511 subpopulation with suppressive properties, that characteris-512 tically express CCR4 and CCR8 [63,64], both receptors found 513 in the periodontal tissues of A. actinomycetemcomitans 514 infected mice. Interestingly, during the predominance of the 515 Th1-type response (until 30 days pi) there was an increase in 516 517 the numbers of inflammatory cells and intense bone loss. By contrast, after the rise in the expression of Th2-type media-518 tors (after 30 days pi) the number of inflammatory cells 519 520 remained constant. These findings suggest that the pattern of immune response could determine the stable or progressive 521 nature of the lesion. In agreement, in a previous study we 522 found that a predominant expression of Th2-type chemok-523 ines and IL-10 was associated with chronic periodontitis, 524 while the expression of Th1-type chemokines and of IFN- γ 525 526 predominated in aggressive periodontitis [20].

Taken together, our results suggest that cytokines and 527 chemokines are involved in the immunopathogenesis of PD, 528 by driving the selective migration of distinct cell types and 529 by promoting the maintenance of specific leukocyte subsets 530 in the periodontal tissues. In addition, we demonstrate that 531 C57BL/6 mice submitted to oral inoculation of A. actino-532 *mycetemcomitans* represent a useful experimental model of 533 human PD since they develop the characteristic features of 534 this condition. However, the possible influences of the diet, 535 normal oral flora, and the genetic background of mice on the 536 development of the disease are not known. Since 537 C57BL/6 mice are known to develop a predominant Th1 type 538 539 response [65], it is possible that this model could be not totally reproduced in other mouse strains. 540

Finally, knowledge regarding the role of cytokines and 541 chemokines in the outcome of PD may provide the basis for future therapeutic interventions, in order to limit the inflammatory process while improving rapid repair of periodontal tissues. 545

G.P. Garlet et al. / Microbes and Infection (2005)

546 5. Uncited reference

547 [66].

548 Acknowledgements

- 549 This study was supported in part by Fundação de Amparo
- 550 à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (2004/06731/8).
- 551 G.P.G. is a Ph.D. student with a scholarship from FAPESP
- 552 (01/09998-7). J.S.S. is research fellow of the Conselho Nacio-
- 553 nal de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

554 References

- J. Slots, Update on Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in human periodontal disease, J. Int. Acad.
 Periodontol. 4 (1999) 121–126.
- P. Fives-Taylor, D. Meyer, K. Mintz, C. Brissette, Virulence factors of
 Actinobacillus actinomycetemcomitans, Periodontology 2000 20
 (1999) 136–167.
- [3] B. Henderson, M. Wilson, L. Sharp, J.M. Ward, Actinobacillus actinomycetemcomitans, J. Med. Microbiol. 51 (2002) 1013–1020.
- 563 [4] B. Henderson, S.P. Nair, J.M. Ward, M. Wilson, Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, Annu. Rev. Microbiol. 57 (2003) 29–55.
- 566 [5] Y. Jiang, D.T. Graves, Periodontal pathogens stimulate
 567 CC-chemokine production by mononuclear and bone-derived cells, J.
 568 Periodontol. 70 (1999) 1472–1478.
- M. Oido-Mori, R. Rezzonico, P.-L. Wang, Y. Kowashi, J.M. Dayer,
 P.C. Baehni, et al., *Porphyromonas gingivalis gingipain*-R enhances
 interleukin-8 but decreases gamma interferon-inducible protein
 production by human gingival fibroblast in response to T-cell
 contact, Infect. Immun. 69 (2001) 4493–4501.
- 574 [7] D.T. Graves, A.J. Delima, R. Assuma, S. Amar, T. Oates, D. Cochran,
 575 Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the pro576 gression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in
 577 experimental periodontitis, J. Periodontol. 69 (1998) 1419–1425.
- [8] R. Attstrom, The roles of gingival ehpithelium and phagocytosing
 [579] leukocytes in gingival defence, J. Clin. Periodontol. 2 (1975) 25–29.
- D.E. Deas, S.A. Mackey, H.T. McDonnell, Systemic disease and periodontitis: manifestations of neutrophil dysfunction, Periodontology 2000 32 (2003) 82–104.
- [10] D.F. Lappin, O. Koulouri, M. Radvar, P. Hodge, D.F. Kinane, Relative
 proportions of mononuclear cell types in periodontal lesions analyzed
 by immunohistochemistry, J. Clin. Periodontol. 26 (1999) 183–189.
- 586 [11] D.F. Kinane, D.F. Lappin, Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease, Acta Odontol. Scand. 59 (2001) 154–160.
- 589 [12] Text missing.
- 590 [13] K. Yamazaki, H. Yoshie, G.J. Seymour, T cell regulation of the immune response to infection in periodontal diseases, Histol. Histopathol. 18 (2003) 889–896.
- 593 [14] D. Rossi, A. Zlotnik, The biology of chemokines and their receptors,
 594 Annu. Rev. Immunol. 18 (2000) 217–242.
- 595 [15] S.A. Luther, J.G. Cyster, Chemokines as regulators of T cell differentiation, Nat. Immunol. 2 (2001) 102–107.
- 597 [16] C. Gerard, B.J. Rollins, Chemokines and disease, Nat. Immunol. 2598 (2001) 108–115.
- 599 [17] M.S. Tonetti, M.A. Imboden, L. Gerber, N.P. Lang, J. Laissue,
 600 C. Mueller, Localized expression of mRNA for phagocyte-specific
 601 chemotactic cytokines in human periodontal infections, Infect.
 602 Immun. 62 (1994) 4005–4014.

- [18] J. Gamonal, A. Acevedo, A. Bascones, O. Jorge, A. Silva, Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis, J. Periodont. Res. 36 (2001) 194–203.
- [19] E. Gemmel, C.L. Carter, G.J. Seymour, Chemokines in human periodontal disease tissues, Clin. Exp. Immunol. 125 (2001) 134–141.
 608
- [20] G.P. Garlet, W. Martins Jr., B.R. Ferreira, C.M. Milanezi, J.S. Silva, 609
 Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease, J. Periodont. Res. 38 (2003) 611
 210–217. 612
- [21] A.K. Abbas, K.M. Murphy, A. Sher, Functional diversity of T helper lymphocytes, Nature 383 (1996) 787–793.614
- [22] T.R. Mosmann, R.L. Coffman, Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties, Annu. Rev. Immunol. 7 (1989) 145–173.
 617
- [23] D. Jankovic, Z. Liu, W.C. Gause, Th1 and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways, Trends Immunol. 22 (2001) 450–457.
 620
- [24] F.B. Mercado, R.I. Marshall, P.M. Bartold, Inter-relationships 621
 between rheumatoid arthritis and periodontal disease. A review, J. 622
 Clin. Periodontol. 30 (2003) 761–772. 623
- [25] P.J. Baker, R.T. Evans, D.C. Roopenian, Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and induced alveolar bone loss in immunocompetent and sever combined immunodeficient mice, Arch. Oral Biol. 39 (1994) 1035–1040.
- [26] C.A. Genco, T. Van Dyke, S. Amar, Animal models for *Porphyromononas gingivalis*-mediated periodontal disease, Trends Microbiol. 6 (1998) 444–449.
 630
- [27] C.B. Wiebe, C.A. Adkins, E.E. Putnins, L. Hakkinen, H. Jarjava, Naturally occurring periodontal bone loss in the wild deer mouse, genus *Peromyscus*, J. Periodontol. 72 (2001) 620–625.
 633
- [28] M.J. Avila-Campos, M.A. Carvalho, F. Zelante, Distribution of biotypes and antimicrobial susceptibility of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Oral Microbiol Immunol. 10 (1995) 382–384 M.J.
 Avila-Campos, C.T. Sacchi, A.M. Whitney, A.G. Steigerwalt, L.W.
 Mayer, Specific primer for AP-PCR identification of Actinobacillus actinomycetemcomitans, J. Clin. Periodontol. 26 (1999) 699–704.
- [29] D.T. Graves, D. Cochran, The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction, J. Periodontol. 74 641 (2003) 391–401.
- [30] E. Gemmell, G.J. Seymour, Immunoregulatory control of 643 Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease, Periodontology 644 2000 35 (2004) 21–41.
- [31] S. Pestka, C.D. Krause, D. Sarkar, M.R. Walter, Y. Shi, F.B. Fisher, P.B., interleukin-10 and related cytokines and receptors, Annu. Rev. Immunol. 22 (2004) 929–979.
- [32] D. Agnello, C.S. Lankford, J. Bream, A. Morinobu, M. Gadina,
 J.J. O'Shea, D.M. Frucht, Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights, J. Clin. Immunol. 23 (2003) 147–161.
- [33] K.M. Murphy, S.L. Reiner, The lineage decisions of helper T cells, Nat. Rev. Immunol. 2 (2002) 933–944.
 654
- [34] T. Ukai, Y. Mori, M. Onoyama, Y. Hara, Immunohistological study of interferon-g and interleukin-4-bearing cells in human periodontitis gingival, Arch. Oral Biol. 46 (2001) 901–908.
 657
- [35] T. Kawai, R. Eisen-Lev, M. Seki, J.W. Eastcott, M.E. Wilson, M.A. Taubman, Requirement of B7 costimulation for Th1-mediated inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease, J. Immunol. 164 (2000) 2102–2109. 661
- [36] J.W. Eastcott, K. Yamashita, M.A. Taubman, Y. Harada, D.J. Smith,
 Adoptive transfer of cloned T helper cells ameliorates periodontal disease in nude rats, Oral Microbiol. Immunol. 9 (1994) 284–289.
- [37] H. Sasaki, L. Hou, A. Belani, C.Y. Wang, T. Uchiyama, R. Muller, et al., IL-10, but not IL-4, supresses infection-stimulated bone resorption in vivo, J. Immunol. 165 (2001) 3626–3630.

9

G.P. Garlet et al. / Microbes and Infection (2005)

- [38] Y. Iwasaki, Y. Hara, T. Koji, Y. Shibata, P.K. Nakane, I. Kato, Differential expression of IFN-gamma, IL-4, IL-10, and IL-1beta mRNAs in
 decalcified tissue sections of mouse lipopolysaccharide-induced periodontitis mandibles assessed by in situ hybridization, Histochem. Cell
 Biol. 109 (1998) 339–347.
- [39] P.J. Zwijnenburg, M.M. Polfliet, S. Florquin, T.K. Van den Berg,
 C.D. Dijkstra, S.J. Van Deventer, J.J. Roord, T. Van der Poll, A.M. Van
 Furth, CXC-chemokines KC and macrophage inflammatory protein-2
 (MIP-2) synergistically induce leukocyte recruitment to the central
 nervous system in rats, Immunol. Lett. 85 (2003) 1–4.
- 678 [49] J.M. Farber, Mig and IP-10: CXC chemokines that target lympho-679 cytes, J. Leukoc. Biol. 61 (1997) 246–257.
- 680 [40] M. Miyauchi, S. Kitagawa, M. Hiraoka, A. Saito, S. Sato, Y. Kudo,
 681 et al., Immunolocalization of CXC chemokine and recruitment of
 682 polymorphonuclear leukocytes in the rat molar periodontal tissue
 683 after topical application of lipopolysaccharide, Histochem. Cell Biol.
 684 121 (2004) 291–297.
- 685 [41] A. Rot, U.H. Von Andrian, Chemokines in innate and adaptive host
 686 defense, basic chemokinese grammar for immune cells, Annu. Rev.
 687 Immunol. 22 (2004) 891–928.
- 688[42]M. Del Fabbro, L. Francetti, L. Pizzoni, R.L. Weinstein, Congenital
neutrophil defects and periodontal diseases, Minerva Stomatol. 49690(2000) 293–311.
- 691[43]R.J. Waddington, R. Moseley, G. Embery, Reactive oxygen species: a692potential role in the pathogenesis of periodontal diseases, Oral Dis. 6693(2000) 138–151.
- 694[44]F. Sallusto, D. Lenig, C.R. Mackay, A. Lanzavecchia, Flexible pro-695grams of chemokine receptor expression on human polarized T helper6961 and 2 lymphocytes, J. Exp. Med. 187 (1998) 875–883.
- 697 [45] F. Sallusto, C.R. Mackay, A. Lanzavecchia, The role of chemokine
 698 receptors in primary, effector, and memory immune responses, Annu.
 699 Rev. Immunol. 18 (2000) 593–620.
- 700 [46] G.J. Seymour, R.N. Powell, W.I. Davies, Conversion of a stable T-cell
 701 lesion to a progressive B-cell lesion in the pathogenesis of chronic
 702 inflammatory periodontal disease: an hypothesis, J. Clin. Periodontol.
 703 6 (1979) 267–277.
- 704[47]S. Schrum, P. Probst, B. Fleischer, P.F. Zipfel, Synthesis of the705CC-chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, and RANTES is associated706with a type 1 immune response, J. Immunol, 157 (1996) 3598–3604.
- 707 [48] P. Loetscher, M. Uguccioni, L. Bordoli, M. Baggiolini, B. Moser,
 708 C. Chizzolini, et al., CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes,
 709 Nature 391 (1998) 344–345.
- [50] I. Goya, J. Gutierrez, R. Varona, L. Kremer, A. Zaballos, G. Marquez,
 Identification of CCR8 as the specific receptor for the human beta chemokine I-309: cloning and molecular characterization of murine
- 713 CCR8 as the receptor for TCA-3, J. Immunol. 160 (1998) 1975–1981.
- 714 [51] D. D'Ambrosio, A. Iellem, R. Bonecchi, D. Mazzeo, S. Sozzani,
 715 A. Mantovani, F. Sinigaglia, Selective up-regulation of chemokine
 716 receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type
- 717 2 Th cells, J. Immunol. 161 (1998) 5111–5115.

- [52] A. Zingoni, H. Soto, J.A. Hedrick, A. Stoppacciaro, C.T. Storlazzi, 718
 F. Sinigaglia, D. D'Ambrosio, A. O'Garra, D. Robinson, M. Rocchi, 719
 A. Santoni, A. Zlotnik, M. Napolitano, The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells, J. Immunol. 161 (1988) 547–551 1998).
 722
- [53] J. Schytte, I.J. Blix, K. Helgeland, E. Hvattum, T. Lyberg, T23
 Lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* stimulates production of interleukin-1beta, tumor necrosis factoralpha, interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in human whole blood, J. Periodontal Res. 34 (1999) 34–40.
- [54] H. Kobayashi, T. Nagasawa, M. Aramaki, R. Mahanonda, I. Ishikawa, Individual diversities in interferon gamma production by human peripheral blood mononuclear cells stimulated with periodontopathic bacteria, J. Periodont. Res. 35 (2000) 319–328.
 728
 730
 731

732

733

734

735

736

737

738

762

- [55] M. Yamamoto, K. Kawabata, K. Fujihashi, J.R. McGhee, T.E. Van Dyke, T.V. Bamberg, T. Hiroi, H. Kiyono, Absence of exogenous interleukin-4-induced apoptosis of gingival macrophages may contribute to chronic inflammation in periodontal diseases, Am. J. Pathol. 148 (1996) 331–339.
- [56] P.J. Baker, The role of immune responses in bone loss during periodontal disease, Microbes Infect. 2 (2000) 1181–1192.
- [57] P.J. Baker, M. Dixon, R.T. Evans, L. Dofour, E. Johnson, D.C. Roopenian, CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice, Infect. Immun. 67 (1999) 2804–2809.
 742
- [58] D. Burger, J.M. Dayer, Cytokines, acute-phase proteins, and hormones: IL-1 and TNF-alpha production in contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes, Ann. New York Acad. Sci. 966 (2002) 464–473.
- [59] J. Ma, T. Chen, J. Mandelin, A. Ceponis, N.E. Miller, M. Hukkanen, 747
 et al., Regulation of macrophage activation, Cell. Mol. Life Sci. 60
 (2003) 2334–2346.
- [60] A. Iellem, M. Mariani, R. Lang, H. Recalde, P. Panina-Bordignon,
 F. Sinigaglia, et al., Unique chemotactic response profile and specific
 expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)
 CD25(+) regulatory T cells, J. Exp. Med. 194 (2001) 847–853.
- Y. Onoe, C. Miyaura, T. Kaminakayashiki, Y. Nagai, K. Noguchi, Q.R. Chen, et al., IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing prostaglandin synthesis in osteoblasts, J. Immunol. 156 (1996) 758–764.
- [62] S.H. Wiebe, M. Hafezi, H.S. Sandhu, S.M. Sims, S.J. Dixon, Osteoclast activation in inflammatory periodontal diseases, Oral Dis. 2 (1996) 167–180.
 [63] H. Jonuleit, E. Schmitt, The regulatory T cell family: distinct subsets
 [64] 759 760
- [63] H. Jonuleit, E. Schmitt, The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations, J. Immunol. 171 (2003) 6323–6327.
- [64] S. Sakaguchi, Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses, Annu. Rev. Immunol. 22 (2004) 531–562.
- [65] D. Sacks, N. Noben-Trauth, The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice, Nat. Rev. Immunol. 2 (2002) 845–858.
- [66] S. Seguier, G. Godeau, N. Brousse, Immunohistological and morphometric analysis of intra-oral epithelial lymphocytes and langerhans cells in healthy and diseased human gingival tissues, Arch. Oral Biol. 45 (2000) 441–452.
 772

10

Cytokine profile regulates the expression of matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors expression and modulates the progression of experimental periodontal disease in mice

Gustavo P. Garlet^a, Mario J. Avila-Campos^b,

Cristiane M. Milanezi^a, Beatriz R. Ferreira^a, João S. Silva^{a*}

^a School of Medicine-USP, Department of Biochemistry and Immunology, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil.
^b Anaerobes Laboratory – ICB/USP, Department of Microbiology, Av Lineu Prestes 1374, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil.

Abstract

Objective: Inflammatory reactions raised in response to periodontopathogens are thought to trigger periodontal tissue destruction. We therefore investigated the expression of MMPs and the osteoclastogenic factor RANKL, their respective inhibitors TIMPs and OPG in the course of experimental periodontal disease in mice, and the possible correlation with the expression of inflammatory and regulatory cytokines. Material and Methods: Quantitative polymerase chain reaction (RealTime-PCR) and ELISA were performed with gingival samples of C57Bl/6 mice infected with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Results: Our data showed that the expression of MMPs and RANKL was correlated with the expression of IL-1 β , TNF- α and IFN- γ , in a period with intense increase of inflammatory reaction and alveolar bone loss. On the other hand, IL-4 and IL-10 were associated with higher expression of TIMPs and OPG and with a lower expression of MMPs and RANKL, reducing the rates of increase of cellular infiltration and alveolar bone loss. Conclusions: It is possible that the pattern of cytokines produced in periodontal tissues determines the severity of PD, controlling the breakdown of soft and bone tissues trough the balance between MMPs/TIMPs and RANKL/OPG expression in the gingival tissues.

Keywords: metalloproteinases / RANKL / OPG / cytokines / experimental periodontal disease / Actinobacillus actinomycetemcomitans

1. Introduction

Periodontal diseases (PD), a chronic inflammatory diseases of the attachment structures of the teeth, is one of the most significant causes of tooth loss in adults and the most prevalent form of bone pathology in humans, besides to be a modifier factor of systemic heath of the patients. The bacterial biofilm attached to tooth surface triggers an intense inflammatory reaction, the generation of proteases that degrade extracellular matrix (ECM) and the resorption of alveolar bone, leading to the irreversible loss of tissue attachment in the periodontium (Genco 1992, Baker 2000, Kinane & Lappin 2001, Seymour & Gemmel 2001).

Among host proteases that target the ECM, matrix metalloproteinases (MMPs - a family of zinc- and calcium dependent proteases) play a role in both degradation and remodeling of matrix proteins during different physiologic and pathological processes (Birkedal-Hansen et al 1993). MMPs comprise 4 major subclasses based on their substrate specificity and sequence homology: collagenases such as MMP-1 or interstitial collagenase are active against fibrillar collagen; gelatinases, also called type IV collagenases (A or MMP-2 and B or MMP-9), which present high activity against denaturated collagens; stromelysins, which degrade noncollagen components of extracellular matrix: and membrane type matrix metalloproteinases (Birkedal-Hansen et al 1993, Werb 1997).

The activation of MMPs is regulated by a group of endogenous proteins named tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), that are each capable of inhibiting almost every member of the MMP family in a non-specific way (Baker et al 2002). Usually, the TIMPs are in balance with the MMPs and matrix is remodeled in a highly regulated fashion. However, in many disease processes the levels of MMPs are elevated without a concomitant increase in TIMPs, resulting in tissue destruction (Reynolds 1996, Dean et al 1989, Murphy et al 1991, Nawrocki et al 1997). It is thought that MMPs and TIMPs are involved in the physiological turnover of periodontal tissues, and MMPs appear to be involved in tissue destruction in PD (Birkedal-Hansen et al 1993^a, Reynolds et al 1994, Van der Zee et al 1997, Golub et al 2001). However, there are contradictory results regarding MMPs/TIMPs balance in pathological versus healthy gingival samples (Dahan et al 2001, Nomura et al 1998, Aiba et al 1996, Ingman et al 1996, Kubota et al 1996, Garlet et al 2004), and their contribution towards the pathogenesis of periodontitis is not completely understood

In addition to the destruction of connective tissue, alveolar bone loss is a key event in PD. The integrity of bone tissues depends on maintaining a delicate equilibrium between

> * Corresponding author: Phone: 16. 602 3234 Fax: 16. 633 6840. Av. Bandeirantes 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil. *E-mail adresss:* jsdsilva@fmrp.usp.br (J.S. Silva)

bone resorption by osteoclasts and bone formation by osteoblasts. RANKL (receptor activator of nuclear factor-kB ligand); its cellular receptor, RANK; and the decoy receptor, osteoprotegerin (OPG) have been identified as the key molecular regulation system for bone remodeling. RANKL is the main stimulatory factor for the differentiation and activation of osteoclasts. The effects of RANKL are counteracted by OPG, which strongly inhibits bone resorption by preventing RANK-RANKL engagement (Teitelbaum 2000, Katagiri & Takahasi 2002). The imbalances of this system are pivotal components of the etiology of some bone disorders (Rodan & Martin 2000, Sezer et al 2002, Romas et al 2002). Regarding PD, increased levels of RANKL are found in diseased tissues, and their balance with OPG expression is supposed to determine disease severity (Teng YT 2000, Crotti T 2003, Liu D 2003, Garlet et al 2004, Valverde P 2004, Mogi M 2004).

It is also important to establish the factors that regulate the breakdown of homeostasis of connective and osseous tissue that takes place in PD. Inflammatory mediators, such as prostaglandins (PGE2), IL-1 and TNF-a, and the Th1 type cvtokine IFN- γ , have been described as positive regulators of osteoclastogenesis and of expression of MMPs (Harris et al 2002. Katagiri & Takahashi 2002). The reverse effect is exerted by the Th2 type cytokines such as IL-4, IL-10 and IL-13 (Harris et al 2002, Katagiri & Takahashi 2002). In periodontal lesions, the balance between the expression of Th1 and Th2 type mediators is thought to be a relevant factor to the outcome of disease, probably regulating the balance of MMPs/TIMPs and RANKL/OPG (Ukai et al 2001, Taubman & Kawai 2001, Teng 2002, Garlet et al 2003, Gemmel & 2004, Yamazaki K 2004,Garlet et al 2004). Seymour However, the kinetics of expression of MMPs/TIMPs, and RANKL/OPG in the time course of PD, and their relevance to disease progression/outcome are not known.

In the present study, we investigated the pattern of expression of mRNAs encoding for MMPs, TIMPs, RANKL and OPG by quantitative polymerase chain reaction (RealTime-PCR), and further correlated them with the profile of cytokine produced in the course of experimental periodontal disease in mice.

2. Material and methods

2. Induction of periodontal disease

Experimental animal groups comprised eight-week-old male C57BL/6 mice, bred and maintained in the animal house of Department of Biochemistry and Immunology, School of Medicine of Ribeirão Preto-USP. The experimental protocol was approved by the local Institutional Animal Care and Use Committee. Actinobacillus actinomycetemcomitans (ATCC 29522) was anaerobically grown in supplemented agar medium (TSBV) as previously described (Avila-Campos et al 1995). Initially the animals received the injection of 1x109 CFU of AA diluted in 10µl of PBS in the palatal gingival tissue of the molars and, immediately after, 1x109 CFU of AA in 100µl of PBS with of 2% of carboxymethylcellulose directly placed in the oral cavity. After 48 and 96 h the procedure of oral inoculation was repeated. Negative controls included sham-infected mice, which received PBS with carboxymethylcellulose solution without AA and non-infected animals.

2.1. Isolation and quantification of inflammatory cells from periodontal tissues

To isolate and characterize leukocytes present in the lesion site, whole buccal and palatal periodontal tissues of

upper molars were collected and incubated 1 h at 37°C, dermal side down on RPMI 1640, supplemented with NaHCO₃, penicillin/streptomycin/gentamycin, and 0.28 Wunsch units/ml of liberase blendzyme CI (Roche - F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland). The tissues of 5 mice at each time point per group were processed in the presence of 0.05% DNase (Sigma-Aldrich, Steinhein, Germany) using Medimachine (BD Biosciences PharMingen, San Diego, CA) according to the manufacturer's instructions. After processing, cell viability was assessed by trypan blue exclusion, and the cell count was performed in a Neubauer chamber.

2

2.2. Quantification of alveolar bone loss

Evaluation of the extent of alveolar bone loss was performed as previously described (Baker et al 1994). Previously, the maxilles were hemisected, exposed overnight in 3% hydrogen peroxide and mechanically defleshed. The palatal faces of the molars were photographed with 20X magnification using a dissecting microscope (Leica, Wetzlar, Germany), with the oclusal face of the molars positioned perpendicularly to the base. The images were digitized, and analyzed by a blinded investigator using ImageTool 2.0 software (The University of Texas Health Science Center, San Antonio). The quantification analysis comprises the measurement of the area between the cemento-enamel junction (CEJ) and the alveolar bone crest (ABC), in arbitrary units of area (AUA), corresponding to the pixels contained in the selected area in the 3 posterior teeth. At each time, 5 animals were analyzed, and for each animal the alveolar bone loss was defined as the media of CEJ-ABC between the right and the left arch.

2.3. RNA extraction

The extraction of total RNA of gingival palatal tissues was performed with the Trizol reagent following the protocol recommended by manufacturer (Life Technologies, Rockville, MD). Shortly, Trizol (1 ml for 1 mg of tissue) was added to the sample, shaken for 30 seconds and incubated at room temperature for 5 minutes. For each 1 ml of the suspension 0,2 ml of chloroform (Sigma Co., St. Louis, MO) was added and centrifuged to 12000 g for 15 minutes at 4°C. The aqueous phase was transferred for a new tube, to which the same volume of isopropanol. The sample was shaken, incubated by 20 minutes for -20°C and centrifuged again as previously described. The precipitate was washed in ethanol 100% and dried at room temperature. RNA samples were suspended in 50 µl of deionizied RNAse free water and stored at -70°C. An aliquot of 5 µl was used for obtaining the concentration of $RNA/\mu l$ in the samples, using the $\tilde{G}eneQuant$ (Pharmacia Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

2.4. REAL-TIME PCR reactions

Complementary DNA (cDNA) was synthesized using 3 μ g of RNA through a reverse transcription reaction (Superscript II, Gibco Life Technologies, Grand Island, NY USA). RealTime-PCR quantitative mRNA analyses were performed in an ABI Prism 7000 Sequence Detection System using the SYBR-green fluorescence quantification system (Applied Biosystems, Warrington, UK) for quantitation of amplicons. The standard PCR conditions were 95°C (10 minutes), and then 40 cycles of 94°C (1 minute), 56°C (1 minute), and 72°C (2 minutes), followed by the standard denaturation curve. The sequences of primers were designed using the PrimerExpress software (Applied Biosystems, Warrington, UK) using nucleotide sequences present in the GenBank database. The primers sequences, the predicted amplicom sizes, the annealing and Melting temperatures are

depicted in Table 1. PCR conditions for each target were conscientiously optimized with regard to primer concentration, absence of primer dimer formation, and efficiency of amplification of target genes and housekeeping gene control. SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), 200 nM specific primers, and 2.5 ng of cDNA were used in each reaction. Threshold for positivity of RealTimePCR was determined based in negative controls. The prevalence of subjects from each study group for positive expression of the message for the genes of interest is shown in Table 3. Calculations for determining the relative level of gene expression were made according to the instructions from User's Bulletin (P/N 4303859) from Applied Biosystems, by reference to the beta-actin in the sample, using the cycle threshold (Ct) method. Briefly, Ct is the point at which the exponential increase in signal (fluorescence) crosses a somewhat arbitrary signal level (usually 10 times background). The mean Ct values from duplicate measurements were used to calculate expression of the target gene with normalization to a housekeeping gene used as internal control (beta-actin), using the 2– Δ Ct formula, also according to User's Bulletin. Negative controls without RNA and without reverse transcriptase were also performed. One experiment representative of three.

Table 1. Primers sequences and reaction properties

Target	Sense and anti-sense sequences	tA (°C)	tM (°C)	bp
MMP-1	TGGACCTGGAGGAAATCTTGC	58	79	155
	AGAGTCCAAGAGAATGGCCGA			
MMP-2	CTGATGGCACCCATTTACACCT	60	82	186
	GATCTGAGCGATGCCATCAAA			
MMP-9	AGAGATGCGTGGAGAGTCGAA	65	85	162
	AAGGTTTGGAATCTGCCCAGG			
TIMP-1	ACTGCAGGATGGACTCTTGCA	30	82	206
	TTTCAGAGCCTTGGAGGAGCT			
TIMP-2	CAAGTTCTTCGCCTGCATCAA	61	84	155
	TCGAAACCCTTGGAGGCTT			
TIMP-3	TTCTCAGCGAGGATGGCACTT	60	81	200
	AAACACGGTTCAGGATGCTGG			
RANKL	CAGAAGATGGCACTCACTGCA	65	73	203
	CACCATCGCTTTCTCTGCTCT			
OPG	GGAACCCCAGAGCGAAATACA	57	77	225
	CCTGAAGAATGCCTCCTCACA			
TNF-α	AAGCCTGTAGCCCATGTTGT	56	79	330
	CAGATAGATGGGCTCATACC			
IFN-y	AT GAAATATACA AGTTATATCATG	58	77	501
	TGTTTCGAGGTCGAAGAGCATCCC			
IL-4	GCGATA TCACCTTACA GGAG	58	82	308
	TGTCCTGTG AAGGAAGCCAAC			
IL-10	AGATC TCCGAGATGC CTTCA	58	85	307
	CCGTGGAGCAGGTGAAGAAT			
β-actin	ATGTTTGAGACCTTCAACA	56	75	495
	CACGTCAGACTTCATGATGG			

At: annealing temperature; Mt: Melting temperature; bp: base pairs of amplicon size.

2.5. Protein extraction and cytokine ELISA

Measurements of cytokine in periodontal tissues were performed as previously described (Talvani A et al 2003). For protein extraction, palatal periodontal tissue were homogenized in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4, centrifuged at 1000 rpm at 4 °C and supernatants were stored at -70 °C. The concentrations of cytokines in periodontal extracts were detemined by ELISA using commercially available available kits (all from R&D Systems, Minneapolis, USA), as follows: IL-1b (sensitivity, >3 pg/ml), TNF-a (>3.4 pg/ml), IFN-g (>2 pg/ml), IL-4 (>2 pg/ml) and IL-10 (>4 pg/ml). All assays were carried out according to the manufacturer's instructions. Results were expressed as picograms of cytokine per milligram of periodontal tissue.

2.6. Statistical analysis

Bone levels and inflammatory cells values were submitted to the statistical test ONE-WAY ANOVA, followed by Bonferroni post test. To access possible differences in the intensity of mRNA expression and in the cytokine levels in the course of disease, ANOVA followed by Bonferroni test were performed. Linear regression and Spearman analysis was used to test possible correlations between the levels of expression of MMPs, TIMPs, RANKL and OPG compared to levels of cytokines expression. For all the tests used, values of P<0.05 were considered statistically significant. All statistical tests were performed with the GraphPad InStat 3.05 and GraphPad Prism 3.0 software (GraphPad Software Inc, San Diego, CA).

3. Results

3.1. Analysis of the inflammatory reaction and alveolar bone level

In order to validate the effectiveness of the establishment of the experimentally AA-induced PD, we evaluated the inflammatory reaction and alveolar bone loss, the key events in PD. We found that AA-infected mice presented a significant increase in the number of leukocytes extracted from periodontal tissues at 15d (P<0.01), 30d (P<0.01) and 60d (P<0.001) post infection (fig 1A), when compared to shaminfected and non-infected mice (fig 1A). We also verified that AA-infected mice presented horizontal bone loss, verified by the increase in the area between the cement-enamel junction (CEJ) and the alveolar bone crest (ABC) at 30d (P<0.01) and 60d (P<0.001) post infection (fig 1B). We also analyzed the rate of increase of inflammatory cell counts and alveolar bone loss in two distinct periods in the course of disease (the initial period, comprised from infection time until 30d of infection, and the late period, comprised between 30 and 60 days post infection). We found that both inflammatory reaction and alveolar bone loss presented high increase rates in the initial period (0-30 days). On the contrary, in the late period (30-60days) both inflammatory (p<0.001) and bone loss (p<0.01) indexes are significantly lower than in the initial period.

3.2. Quantitative analysis of MMPs and TIMPs mRNA expression

In order to evaluate the role of MMPs and TIMPs balance in the course of experimental PD, we first evaluated the kinetics of their mRNA expression in periodontal tissues from AA-infected C57Bl/6 mice (fig. 2). The expression of MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-9) and TIMPs (TIMP-1, TIMP-2 and TIMP-3) was found to be constitutive, being detected in low levels at 0h (fig. 2A-B), likewise on non infected mice (data not shown). During the course of disease, the expression of MMP-1 was found to be increased at 24h, 7d and 15d post infection (*p<0.05 vs control), and then presented a significant



Figure 1. Inflammatory reaction and alveolar bone loss in in A. actinomycetemcomitans infected mice. C57Bl/6 mice were inoculated orally with Actinobacillus actinomycetemcomitans, periodontal samples were taken and the inflammatory infiltrate and the alveloar bone level was evaluated. (A) Count of leukocytes extracted from periodontal tissues were performed in a Neubauer chamber (hemacytometer) (B). Measurements of bone levels were done based in CEJ-ABC in the palatal face of maxillary molars, with ImageToll2.0 software. Infected group presents statistically significant bone loss compared to control and sham-infected groups (B). Values (mean + SD) obtained of 5 animals in each time was analyzed with ONE-WAY ANOVA, Bonferroni post test, (*)P<0.05, performed with GraphPad Prism 3.0 software (GraphPad Software Inc).



Figure 2. Kinetics of MMPs, TIMPs, RANKL and OPG in the course of experimental PD. Periodontal tissues of C57BL/6 mice inoculated orally with Actinobacillus actinomycetemcomitans were harvested from zero (before infection) until 60 days of infection. Total RNA was extracted, and levels of MMPs, TIMPs, RANKL, OPG and catepsin K mRNA were measured quantitatively by RealTimePCR SYBR-Green System, as described in material and methods. The results are presented as the expression of the individual mRNAs with normalization to beta-actin, using the Ct method. The results (mean + SD) represent values from duplicate measurements from one experiment representative of three. * P<0.05 compared to 0h, ** P<0.05 compared to selected bars. ONE-WAY Anova, followed by Bonferroni post test, performed with GraphPad Prism 3.0 software (GraphPad Software Inc).

decrease at 30d and 60d post infection (*p<0.05 vs control; ** p<0.05 vs selected bars)(Fig, 2A). Similarly, the expression of MMP-2 and MMP-9 showed a growing expression from 24h until 15d of infection (*p<0.05 vs control), and a decreased expression at 30 and 60 days (*p<0.05 vs control; ** p<0.05 vs selected bars) (Fig, 2A). In contrast, the expression of TIMPs (TIMP-1, TIMP-2 and TIMP-3) presented a modest increase after 24h until 15 days of infection, and a significant augmented expression at 30d and 60d (*p<0.05 vs control; ** p<0.05 vs selected bars) (Fig, 2B). The levels of expression of the housekeeping gene B-actin were used as positive controls and to normalize the levels of the other target genes studied.

3.3. Quantitative analysis of osteoclast factors mRNA expression

We next evaluated the expression of the osteoclastogenic factor RANKL its antagonist OPG; and catepsin K, a key enzyme in bone resorption process (fig. 2C). The expression of RANKL was detected at 24h after infection, at 7 and 15 days of infection their expression was significant increased (*p<0.05 vs control), and a significant decrease was found at 30 and 60d (*p<0.05 vs control; ** p<0.05 vs selected bars). The expression of catepsin K was detected in similar levels at 7 and 15 days of infection, and a significant decrease in their expression was found at 30 and 60d. On the contray, the expression of OPG presented a small increase at 24h, 7d and 15d after infection, while a significant increase was found at

30 and 60 days post infection (*p<0.05 vs control; ** p<0.05 vs selected bars).

3.4. Quantitative analysis of cytokines mRNA expression

We next asked if the differences in the expression of MMPs, TIMPs, RANKL and OPG could be due the differential expression of cytokines that are known to be regulators of their expression (Fig. 3). Infected mice exhibited high levels of messages for TNF-a, IL-1b and IFN-g at 24h, 7d and 15d after infection (*p<0.05 vs control), and such expression was found to be decreased at 30 and 60 days (*p<0.05 vs control; ** p<0.05 vs selected bars)(Fig. 3). The expression of IL-12 was found to be higher at 24h after infection (*p<0.05 vs control), and them decreases after 7 days of infection. The expression of IL-10 messages was detected at low levels at days 7 and 15 (*p<0.05 vs control), and them presented a significant increase at 30 and 60 days post infection (*p<0.05 vs control; ** p<0.05 vs selected bars). IL-4 mRNA was only detected at 30d and 60d (*p<0.05 vs control) in similar levels. Control groups showed no cytokine mRNA expression in periodontal tissues (data not shown).

3.5. ELISA analysis of cytokines in periodontal tissues

In order to confirm reinforce RealTimePCR findings, we also performed ELISA for the quantification of levels of cytokine



Figure 3. Kinetics of IL-1b, TNF-a, IFN-y, IL-12, IL-10 and IL-4 expression in the course of experimental PD. Periodontal tissues of inoculated Actinobacillus C57BL/6 orally with mice actinomycetemcomitans were harvested from zero (before infection) until 60 days of infection. Total RNA was extracted, and levels of IL-1b, TNF- α , IFN γ , IL-12, IL-10 and IL-4 mRNA were measured quantitatively by RealTimePCR SYBR-Green System, as described in material and methods. The results are presented as the expression of the individual mRNAs with normalization to beta-actin, using the Ct method. The results (mean + SD) represent values from duplicate measurements from one experiment representative of three. * P<0.05 compared to 0h, ** P<0.05 compared to selected bars. ONE-WAY Anova, followed by Bonferroni post test, performed with GraphPad Prism 3.0 software (GraphPad Software Inc).

exhibited high levels of TNF-a, IL-1b and IFN-g at 24h, 7d and 15d after infection (*p<0.05 vs control), and such expression was found to be decreased at 30 and 60 days (*p<0.05 vs control; ** p<0.05 vs selected bars)(Fig. 3). IL-4 and IL-10 protein were only detected at 30d and 60d (*p<0.05 vs control). Control groups showed no cytokine mRNA expression in periodontal tissues (data not shown).

3.6. Correlation analysis of the expression of MMP, TIMPs, RANKL and OPG with expression of cytokines in diseased periodontal tissues

We also investigated the possible correlations between the levels of expression of MMPs. TIMPs. RANKL and OPG and the levels of cytokines expressed in periodontal tissues. Trough linear regression and Pearson correlation analysis we found positive correlations were found between expression of IFN-y and that of MMP-1 (P=0.0044, R=0.9453), IFN-y and MMP-2 (P=0.0111, R=0.9126), IFN and MMP-9 (P=0.0112, R=0.9121), IFN-γ and RANKL (P=0.0023, R=0.9608), TNF-α and MMP-1 (P<0.001, R=0.9940), TNF-α and MMP-2 (P=0.0036, R=0.9505), TNF-α and MMP-9 (P=0171, R=0.9505), TNF-α and RANKL (P=0.0020, R=0.9629), IL-1- β and MMP-1 (P=0.0017, R=0.9666), IL-1- β and MMP-2 (P=0.0131, R=0.9051), IL-1-B and RANKL (P=0.0360, R=0.8407), IL-4 and TIMP-1 (P<0.0068, R=0.9318), IL-4 and R=0.9381), TIMP-3 (P=0.0056, OPG IL-4 and (P=0.0039,R=0.9487), IL-10 and TIMP-1



Figure 4. ELISA measurement of IL-1b, TNF-α, IFN-γ, IL-4 and IL-10 in the course of experimental PD. Periodontal tissues of C57BL/6 mice inoculated orally with Actinobacillus actinomycetemcomitans were harvested from zero (before infection) until 60 days of infection. Gingival levels of IL-1b, TNF- α , IFN γ , IL-10 and IL-4 were determined at the indicated times by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as described in material and methods. The results are presented as pg of cytokine per mg of tissue, mean + SD from duplicate measurements, one experiment representative of three. * P<0.05 compared to 0h, ** P<0.05 compared to selected bars. ONE-WAY Anova, followed by Bonferroni post test, performed with GraphPad Prism 3.0 software (GraphPad Software Inc).

and TIMP-2 (P=0.0062 R=0.9349), IL-10 and TIMP-3 (P=0.0381, R=0.8361), IL-10 and OPG (P=0.0018, R=0.9648)(Fig.4).

4. Discussion

In the present study we showed that mice submitted to oral inoculation of A. actinomycetemcomitans developed PD, characterized by an intense migration of leukocytes to the gingival tissues, besides marked bone resorption (Fig.1). Since MMPs and RANKL are supposed to be involved in the disease process, we investigated the expression such potentially destructive mediators and their respective inhibitors TIMPs and OPG, in the periodontal tissues of AA infected mice. We found that both MMPs and TIMPs were constitutively expressed in low levels in healthy periodontal tissues of mice (fig.2). In fact, the expression of MMPs and TIMPs is regularly found in healthy human periodontal tissues, and are supposed to be involved in the physiological turnover of periodontal tissues (Ryan et al 1996, Sodek & Overall 1992). Our data also demonstrate two distinct patters of MMPs/TIMPs expression in the course of experimental PD. During the initial phase of disease, between 24h until 30 days of infection, we found a significant increase in MMPs expression and a small increase in TIMPs expression compared to controls. In contrast, in a late disease period, between 30 and 60 days of infection, we detected a decrease in



Figure 5. Correlation between the expression of mRNA for MMPs, TIMPs, RANKL and OPG and mRNA for cytokines in diseased periodontal tissues. Spearman analysis was used to test the correlations between the levels of expression of MMP-1, TIMP-1, RANKL and OPG compared to levels of the cytokines IL-1b, TNF- α , IFN- γ , IL-4 and IL-10 in the course of experimental PD. Total RNA was extracted, and the individual levels of mRNA were measured quantitatively by a RealTimePCR SYBR-Green System, as described in material and methods. X and Y axis represent the relative mRNA expression to each target gene normalized by beta-actin. The Spearman correlation test and linear regression was performed with the GraphPad Prism 3.0 software (GraphPad Software Inc) and values considered statistically significant are identified in the graphs.

the expression of MMPs, while the expression of TIMPs was significantly increased.

Interestingly, in these same time periods we found remarkable differences in the rate of disease progression. From infection until 30d, there was a marked increase in both inflammatory cell number and bone loss. In contrast, after 30 days of infection, a stable number of inflammatory cells in periodontal tissue and a lower rate of alveolar bone loss were found. These data suggests that the balance of MMPs and TIMPs expression could account for the different degrees of disease progression. In fact, the increased expression of MMPs in diseased periodontal tissues seems to be consensus in the literature, and is thought to account for the destruction of connective and bone tissues (Birkedal-Hansen 1993, Aiba et al 1996, Ingman et al 1996, Ramamurthy et al 2002, Delaisse 2003, Garlet et al 2004). However, data regarding the expression of TIMPs in healthy versus diseased periodontal tissues is contradictory. Some studies show a decrease in the levels of TIMPs in diseased periodontal tissues, supporting the idea that an imbalance in the levels of TIMPs/MMPs takes place in PD and results in tissue destruction (Alexander & Damoulis 1994, Soell et al 2002, Tuter et al 2002). Conversely, other studies detected an increased expression of TIMPs in diseased periodontal tissues (Alpagot et al 2001, Nomura et al 1998, Haerian et al 1995, Garlet et al 2004), which could reflect an attempt to maintain the tissue homeostasis, in the view of the increased expression of MMPs. However, such upregulation of TIMPs may not be enough to compensate for the even higher upregulation of MMPs, and such imbalance would result in periodontal destruction. In accordance, imbalances in the MMPs/TIMPs system (i.e., lower levels of TIMPs and/or higher levels of MMPs) are involved in the pathogenesis of several diseases (Schulze et al 2003, Lanchou et al 2003, Gianelli et al 2002), including rheumatoid arthritis (Golbach et al 2000, Yoshihara et al 2000, Katrib et al 2003, Kong et al 1999, Romas et al 2002), which share several features with PD, including the chronic nature of the inflammatory reaction and tissue destruction activity (Mercado et al 2003).

In addition to the tissue destruction mediated by MMPs, the alveolar bone resorption driven by osteoclasts is another key feature of PD. In view of this, we also examined the expression of the osteoclastogenic factors RANKL, its inhibitor, OPG; and catepsin K, a key enzyme in bone resorption process (Teitelbaum 2000, Delaise 2003). In a similar pattern to that seem to MMPs/TIMPs, we found that the initial phase of PD, presenting higher / faster disease progression, is associated with high catepsin K and RANKL expression and low OPG expression. On the contrary, lower catepsin K and RANKL and higher OPG expression was found in the late period/stage of PD, characterized by lower disease activity. Our data suggests that RANKL/OPG balance determine the rate of bone loss and PD progression. Such hypothesis is supported by data showing that RANKL is closely associated with bone resorption (Teitelbaum 2000, Ritchlin et al 2003), and the blockade of RANKL by OPG leads to a reduction in the alveolar bone loss (Liu et al 2003, Teng et al 2000). In accordance, the balance in RANKL/OPG is supposed to account for modulation of human PD severity (Crotti et al 2003, Mogi 2004, Garlet et al 2004).

Since the balance of both MMPs/TIMPs and RANKL/OPG is supposed to be determined by cytokine

profile, we next used RealTimePCR and ELISA to investigated the cytokines which could regulate the expression of such factors (Teitelbaum 2000, Birkedal-Hansen et al 1993, Nakamura I 2003, Saidenberg Kermanac'h 2002). We found that both mRNA and protein levels of TNF- α , IL-1 β and IFN- γ , were found in high levels from 24h until 15 days and significantly decreased after 30 days of infection, and presented positive correlation with the expression of MMPs and RANKL. Conversely, IL-4 and IL-10 were found in significantly levels only at 30 and 60 days of infection, was positively correlated with the expression of TIMPs and OPG.

These data support our previous findings, showing that the balance in the expression of MMPs/TIMPs and of RANKL/OPG in PD could be due the different patterns of cytokines produced in the tissues (Garlet et al, 2004). In fact, IL-1 and TNF are proinflammatory stimuli that clearly trigger deleterious events which occur in periodontal disease, including the stimulation of matrix metalloproteinase production and bone resorption (Graves DT 2003, Teitelbaum 2000, Birkedal-Hansen et al 1993, Nakamura I 2003).

Despite controversies regarding the role of T helper cytokines in periodontal diseases, Th1 and Th2 cytokines have been shown to be associated with activation and suppression of bone resorption, respectively (Kawashima & Stashenko 1999, Sasaki et al 2000, Kawai et al 2000, Eastcott et al 1994). IFN-y appears to be the predominant cytokine produced by T cells in PD, and an increase in IFN-y-producing cells in the lesions is correlated with the progression of disease (Ukai et al 2001, Roberts et al 1997, Kawai 2000). In contrast, Th2 cytokines (IL-4 and IL-10) are widely expressed in diseased periodontal tissues (Lappin et al 2001, Tokoro et al 1997, Garlet et al 2004) and are associated with suppression of bone resorption (Eastcott 1994, Kawashima & Stashenko 1999, Sasaki et al 2000). Moreover, recent studies have been demonstrated that mixed patterns of immune response are present in diseased periodontal tissues (Berghlund et al 2003, Garlet et al 2003, Teng 2002, Ukai et al 2001), suggesting that the balance of T helper responses could account for the control of disease severity trough the regulation of MMPs/TIMPs and RANKL/OPG systems (Garlet et al 2004, Mogi 2004, Yamazaki 2004, Valverde 2004).

Taken together, our results suggest that higher disease progression is associated with enhanced expression of MMPs and RANKL, that could be induced by TNF- α , IL-1b and/or IFN- γ . In addition, the increased expression of TIMPs and OPG, possibly induced by IL-4 and/or IL-10, could be responsible for the attenuation of the tissue destruction. Therefore, the knowledge regarding the role of the cytokines in the modulation of MMPs/TIMPs and RANKL/OPG systems, and their relevance to the outcome of PD may provide the basis for future therapeutical interventions, in order to limiting the inflammatory process while improve rapid repair of periodontal tissues.

5. Acknowledgements

This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP #0109998-7 (scholarship to G.P.G.) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (scholarship to J.S.S.).

6. References

Aiba, T., Akeno, N., Kawane, T., Okamoto, H. & Horiuchi, N. (1996) Matrix metalloproteinases-1 and -8 and TIMP-1 mRNA levels in normal and diseased human gingivae. European Journal of Oral Sciences 104, 562-569. Alexander, M.B. & Damoulis, P.D. (1994) The role of cytokines in the pathogenesis of periodontal disease. Current Opinnion Periodontology, 39-53.

Alpagot, T., Bell, C., Lundergan, W., Chambers, D.W. & Rudin, R. (2001) Longitudinal evaluation of GCF MMP-3 and TIMP-1 levels as prognostic factors for progression of periodontitis. Journal of Clinical Periodontology 28, 353-359.

Baker, A.H., Edwards, D.R. & Murphy, G. (2002) Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. Journal of Cell Science 115, 3719-3727.

Baker, P.J. (2000) The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. Microbes and Infection 2, 1181-1192.

Birkedal-Hansen, H. (1993) Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. Journal of Periodontology 64, 474-484.

Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A. & Engler, J.A. (1993) Matrix metalloproteinases: a review. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine 4, 197-250

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

Dahan, M., Nawrocki, B., Elkaim, R., Soell, M., Bolcato-Bellemin, A.L., Birembaut, P. & Tenenbaum, H. (2001) Expression of matrix metalloproteinases in healthy and diseased human gingiva. Journal of Clinical Periodontology 28, 128-136.

Dean, D.D., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Howell, D.S. & Woessner J.F.Jr. (1989) Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage.Journal of Clinical Investigation 84, 678-685.

Eastcott, J.W., Yamashita, K., Taubman, M.A., Harada, Y. & Smith, D.J. (1994) Adoptive transfer of cloned T helper cells ameliorates periodontal disease in nude rats. Oral Microbiology & Immunology 9, 284-289.

Garlet, G.P., Martins Jr, W., Ferreira, B.R., Milanezi, C.M. & Silva, J.S. (2003) Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. Journal of Periodontal Research 38, 210-217.

Genco, R.J. (1992) Host responses in periodontal diseases: current concepts. Journal of Periodontology 63, 338-355.

Giannelli, G., Bergamini, C., Marinosci, F., Fransvea, E., Quaranta, M., Lupo, L., Schiraldi, O. & Antonaci, S. (2002) Clinical role of MMP-2/TIMP-2 imbalance in hepatocellular carcinoma. International Journal of Cancer 97, 425-431.

Golub, L.M., McNamara, T.F., Ryan, M.E., Kohut, B., Blieden, T., Payonk, G., Sipos, T. & Baron, H.J. (2001) Adjunctive treatment with subantimicrobial doses of doxycycline: effects on gingival fluid collagenase activity and attachment loss in adult periodontitis. Journal of Clinical Periodontology 28, 146-156

Haerian, A., Adonogianaki, E., Mooney, J., Docherty, J.P. & Kinane, D.F. (1995) Gingival crevicular stromelysin, collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases levels in healthy and diseased sites. Journal of Clinical Periodontology 22, 505-509.

Harris, S.G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D. & Phipps, R.P. (2002) Prostaglandins as modulators of immunity. Trends in Immunology 23, 144-150.

Ingman, T., Tervahartiala, T., Ding, Y., Tschesche, H., Haerian, A., Kinane, D.F., Konttinen, Y.T. & Sorsa, T. (1996) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. Journal of Clinical Periodontology 23, 1127-1132.

Katagiri, T. & Takahashi, N. (2002) Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. Oral Diseases 8, 147-159.

Katrib, A., Smith, M.D., Ahern, M.J., Slavotinek, J., Stafford, L., Cuello, C., Bertouch, J.V., McNeil, H.P. & Youssef, P.P. (2003) Reduced chemokine and matrix metalloproteinase expression in patients with rheumatoid arthritis achieving remission. Journal of Rheumatology 30, 10-21

Kawai, T., Eisen-Lev, R., Seki, M., Eastcott, J.W., Wilson, M.E. & Taubman, M.A. (2000) Requirement of B7 costimulation for Th1mediated inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. Journal of Immunology 164, 2102-2109.

Kawashima, N. & Stashenko, P. (1999) Expression of bone resorptive cytokines and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. Archives of Oral Biology 44, 55-66.

Kinane, D.F. & Lappin, D.F. (2001) Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. Acta Odontologica Scandinavica 59, 154-160.

Kong, Y.Y., Feige, U., Sarosi, I., Bolon, B., Tafuri, A., Morony, S., Capparelli, C., Li, J., Elliott, R., McCabe, S., Wong, T., Campagnuolo, G., Moran, E., Bogoch, E.R., Van, G., Nguyen, L.T., Ohashi, P.S., Lacey, D.L., Fish, E., Boyle, W.J. & Penninger, J.M. (1999) Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. Nature 402, 304-309.

Kubota, T., Nomura, T., Takahashi, T. & Hara, K. (1996) Expression of mRNA for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontitis-affected human gingival tissue. Archives of Oral Biology 41, 253-262.

Lanchou, J., Corbel, M., Tanguy, M., Germain, N., Boichot, E., Theret, N., Clement, B., Lagente, V. & Malledant, Y. (2003) Imbalance between matrix metalloproteinases (MMP-9 and MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in acute respiratory distress syndrome patients. Critical Care Medicine 31, 536-542.

Lappin, D.F., Macleod, C., Kerr, A., Mitchell, T. & Kinane, D.F. (2001) Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. Clinical Experimental Immunology 123, 294-300.

Liu, D., Xu, J.K., Figliomeni, L., Huang, L., Pavlos, N.J., Rogers, M., Tan, A., Price, P. & Zheng, M.H. (2003) Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: Possible involvement in bone destruction. International Journal of Molecular Medicine 11, 17-21

Mercado, F.B., Marshall, R.I., Klestov, A.C. & Bartold, P.M. (2001) Relationship between rheumatoid arthritis and periodontitis. Journal of Periodontology 72, 779-787.

Murphy, G., Docherty, A.J., Hembry, R.M. & Reynolds, J.J. (1991) Metalloproteinases and tissue damage. British Journal of Rheumatology 30, 25-31.

Nawrocki, B., Polette, M., Marchand, V., Monteau, M., Gillery, P., Tournier, J.M. & Birembaut, P. (1997) Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human bronchopulmonary carcinomas: quantificative and morphological analyses. Int J Cancer. 72, 556-564.

Nomura, T., Ishii, A., Oishi, Y., Kohma, H. & Hara, K. (1998) Tissue inhibitors of metalloproteinases level and collagenase activity in gingival crevicular fluid: the relevance to periodontal diseases. Oral Diseases 4, 231-240.

Ramamurthy, N.S., Xu, J.W., Bird, J., Baxter, A., Bhogal, R., Wills, R., Watson, B., Owen, D., Wolff, M. & Greenwald, R.A. (2002) Inhibition of alveolar bone loss by matrix metalloproteinase inhibitors in experimental periodontal disease. Journal of Periodontal Research 37, 1-7.

Reynolds JJ. (1996) Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. Oral Diseases 2, 70-76.

Reynolds, J.J., Hembry, R.M. & Meikle, M.C. (1994) Connective tissue degradation in health and periodontal disease and the roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors. Advances in Dental Research 8, 312-319.

Ritchlin, C.T., Haas-Smith, S.A., Li, P., Hicks, D.G. & Schwarz, E.M. (2003) Mechanisms of TNF-alpha- and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. Journal of Clinical Investigation 111, 821-831.

Roberts, F.A., McCaffery, K.A. & Michalek, S.M. (1997) Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodontitis. Journal of Dental Research 76, 1833-1839.

Rodan, G.A. & Martin, T.J. (2000) Therapeutic approaches to bone diseases. Science 289, 1508-1514.

Romas, E., Gillespie, M.T. & Martin, T.J. (2002) Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. Bone 30, 340-346.

Ryan, M.E., Ramamurthy, S. & Golub, L.M. (1996) Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment. Current Opinion in Periodontology 3, 85-96.

Sasaki, H., Hou, L., Belani, A., Wang, C.Y., Uchiyama, T., Muller, R. & Stashenko, P. (2000) IL-10, but not IL-4, suppresses infectionstimulated bone resorption in vivo. Journal of Immunology 165, 3626-3630.

Schulze, C.J., Wang, W., Suarez-Pinzon, W.L., Sawicka, J., Sawicki, G. & Schulz, R. (2003) Imbalance Between Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-4 and Matrix Metalloproteinases During Acute Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. Circulation 107, 2487-2492.

Seymour, G.J. & Gemmel, E. (2001) Cytokines in periodontal disease: where to from here? Acta Odontologica Scandinavica 59, 167-173.

Sezer, O., Heider, U., Zavrski, I., Kuhne, C.A. & Hofbauer, L.C. (2003) RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease. Blood 101, 2094-2098.

Sodek, J. & Overall, C.M. (1992) Matrix metalloproteinases in periodontal tissue remodelling. Matrix Suppl 1, 352-362.

Soell, M., Elkaim, R. & Tenenbaum, H. (2002) Cathepsin C, matrix metalloproteinases, and their tissue inhibitors in gingiva and gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. Journal of Dental Research 81, 174-178.

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

Taubman, M.A. & Kawai, T. (2001) Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine 12, 125-135.

Teitelbaum SL. (2000) Bone resorption by osteoclasts. Science 289, 1504-1508.

Teng, Y.T. (2002) Mixed periodontal Th1-Th2 cytokine profile in Actinobacillus actinomycetemcomitans-specific osteoprotegerin ligand (or RANK-L)- mediated alveolar bone destruction in vivo. Infection and Immunity 70, 5269-5273.

Teng, Y.T., Nguyen, H., Gao, X., Kong, Y.Y., Gorczynski, R.M., Singh, B., Ellen, R.P. & Penninger, J.M. (2000) Functional human Tcell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. Journal of Clinical Investigation 106, 59-67

Tokoro Y, Matsuki Y, Yamamoto T, Suzuki T, Hara K. Relevance of local Th2-type cytokine mRNA expression in immunocompetent infiltrates in inflamed gingival tissue to periodontal diseases. Clin Exp Immunol 1997;107:166-174.

Tuter, G., Kurtis, B. & Serdar, M. (2002) Effects of phase I periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of matrix

metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1. Journal of Periodontology 73, 487-493.

Ukai, T., Mori, Y., Onoyama, M. & Hara, Y. (2001) Immunohistological study of interferon-g and interleukin-4-bearing cells in human periodontitis gingiva. Archives of Oral Biology 46, 901-908.

Van der Zee, E., Everts, V. & Beertsen, W. (1997) Cytokines modulate routes of collagen breakdown. Review with special emphasis on mechanisms of collagen degradation in the periodontium and the burst hypothesis of periodontal disease progression. Journal of Clinical Periodontology 24, 297-305.

Werb, Z. (1997) ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. Cell 91, 439-442.

Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, Okada Y. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. Ann Rheum Dis. 2000 Jun;59(6):455-61.

The role of TNF-α in the determination of experimental periodontitis severity and in the control of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection

Gustavo P. Garlet^a, Mario J. Avila-Campos^b, João S. Silva^{a*}

^a School of Medicine-USP, Department of Biochemistry and Immunology, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil.
^b Anaerobes Laboratory – ICB/USP, Department of Microbiology, Av Lineu Prestes 1374, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil.

Abstract

Introduction and objectives: Inflammatory immune reactions in response to periodontopathogens are thought to protect the host against infection, but may triggers periodontal destruction. Therefore, we examined the mechanisms by which the proinflammatory cytokine TNF-a modulates the outcome of periodontal disease (PD) induced in mice by the oral inoculation of Actinobacillus actinomycetemcomitans (AA). Methods and results: Our results showed that TNF receptor p55 deficient mice (TNF-KO) developed a less severe PD in response to AA infection, characterized by a significant decrease in both alveolar bone loss and inflammatory reaction. The cell migration is supposed to be diminished due a decreased expression of chemokines (MIP2, MIP1a, MIP1b, RANTES and IP-10) and of the adhesion molecules (ICAM) in periodontal tissues of TNF-KO mice, evaluated by RealTimePCR. In addition, matrix metalloproteinases (MMPs), the osteoclastogenic factor RANKL and catepsin K, thought to be key factors in the pathogenesis of PD, also are found to have their mRNA expression decreased in TNF-KO mice. However, in spite of the lower PD severity, the absence of TNFRp55 result in an impairment of protective immunity to AA infection, characterized by a large increase the bacterial load in gingival tissue, higher levels of C-reactive protein in liver and significant decrease in weight gain during the course of disease. Such impaired host response may be result of the reduced chemmoatraction and activation/activity of phagocytes in periodontal tissues, since both neutrophils and macrophages are found in lower number in periodontal tissues in TNF-KO. In addition, we also found that both iNOS expression and MPO activity were reduced in TNF-KO mice. Conclusion: Our results provide data clarifying the molecular mechanisms involved in the control of inflammatory reaction and alveolar bone loss by TNF-a, and consequently in the determination PD severity. In addition, we demonstrated an important role of TNF-a in provide immune protection to A. actinomycetemcomitans infection.

Keywords: TNFp55 / cytokines / experimental periodontal disease / Actinobacillus actinomycetemcomitans

1. Introduction

Periodontal diseases (PD) are chronic inflammatory diseases of the attachment structures of the teeth, which is one of the most significant causes of tooth loss in adults and the most prevalent form of bone pathology in humans. The bacterial biofilm attached to tooth surface hosts a vast diversity of potentially hazardous bacterial species, which triggers local and systemic inflammatory and immune responses (Genco 1992, Baker 2000, Kinane & Lappin 2001). These host response to periodontopathogens are thought to protect the host against infection, but the persistence of the pathogens may become the protective roles of inflammatory mediators dangerous to the periodontal tissues. In fact, the local action of pro-inflammatory cytokines, including TNF-a, are important etiologic factors of PD (Genco 1992, Baker 2000, Kinane & Lappin 2001, Seymour & Gemmel 2001).

TNF-a play a critical role in the resistance to a wide range of microbial pathogens (Ferrante A 1992, Graves 2000), regulating several aspects of the host response. TNF-a act in several steps of leukocyte recruitment mechnisms, inducing the upregulation of adhesion molecules and the production of chemokines and matrix metalloproteinases (Dinarello 1996, Pfizenmaier et al. 1996, Offenbacher S 1989, Jaing Y 1999, Graves DT 2003, Graves & Jiang 1995, Penberthy et al. 1997). In addition, TNF-a regulates the antigen presentation, expression of costimulatory molecules and the stimulation of bactericidal activity of phagocytes (Dinarello 1996, Pfizenmaier et al. 1996). Most of the

antimicrobial and inflammatory effects effects of TNF-a have been attributed to TNF-a receptor p55 (TNFp55), while the TNFa receptor p75 signaling acts to attenuate the inflammatory response (Amar 1995, Peschon 1998).

Regarding human PD, TNF-a p55 receptor (Tervahartiala T 2001) is widely expressed in diseased periodontal tissue. In accordance, TNF-a are present in high levels in both gingival crevicular fluid and diseased periodontal tissues (Engebretson SP 1999, Rossomando EF 1990, Matsuki Y 1992, Stashenko P 1991, Tervahartiala T 2001, Garlet et al 2004, Wang PL 2003, Gorska R 2003, Graves et al 2003). In fact, TNF-a play a central role in the inflammatory reaction, alveolar bone resorption and in the loss of connective tissue attachment in experimental disease (Assuma 1998, Graves 1998, Delima 2001, Graves 2001, Oates TW 2002). However, the molecular mechanisms linking TNF-a to inflammatory cell migration and to periodontal tissue destruction have not been established. In addition, the theoretical role exerted by TNF-a in the control of periodontal infection remain unknown. To clarify these questions, we infected mice genetically deficient from TNF-p55 with A. actinomycetemcomitans and them carried out experiments evaluating the inflammatory and immune response, the severity of disease and the control of periodontal infection.

^{*} Corresponding author: Phone: 16. 602 3234 Fax: 16. 633 6840. Av. Bandeirantes 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil. *E-mail adresss*: jsdsilva@fmrp.usp.br (J.S. Silva)

2. Material and methods

2.1. Mice

Experimental groups comprised eight-week-old male wild type C57BL/6 mice, and mice with targeted disruption of the TNF receptor p55 (TNFp55KO) (Breeding pairs purchased from Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) bred and maintained in the animal facilities of the Department of Biochemistry and Immunology, School of Medicine of Ribeirão Preto-USP. Throughout the period of the study mice were fed with sterile standard solid mice chow (Nuvital, Curitiba - PR, Brazil), and sterile water. The experimental protocol was approved by the local Institutional Committee for Animal Care and Use.

2.2. Periodontal infection

Periodontal infection was performed as previously described (Garlet et al, *in press*). In brief, the animals received the oral inoculation of 1×10^9 CFU of a diluted culture of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (ATCC 29522, grown anaerobically in supplemented agar medium, TSBV) [28], in 100µl of PBS with 2% of carboxymethylcellulose, placed in the oral cavity with a micropipette. After 48 and 96 h this procedure was repeated. Negative controls included sham-infected mice, which received PBS with carboxymethylcellulose solution without *A. actinomycetemcomitans*, and non-infected animals.

2.3. Histological analysis

Four animals selected at random from each group were sacrificed at 0, 15, 30, and 60 days after infection. The periodontal tissues obtained were then fixed in 4% paraformaldehyde in PBS at pH 7.4 for 12 h at room temperature. The specimens were demineralized thoroughly in 10% ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA) for 1-2 weeks. The decalcified mouse periodontal tissues were trimmed, dehydrated in graded ethanol and embedded in paraffin. Serial sections (5µm) were cut and mounted on glass slides precoated with 0.1% poly-1-lysine (Sigma, St. Louis, MS, USA). Histological assessment was carried out following routine hematoxylin and eosin staining.

2.4. Isolation of inflammatory cells from periodontal tissues and flow cytometric analysis

To isolate and characterize leukocytes present in the lesion site, whole buccal and palatal periodontal tissues of upper molars were collected and incubated for 1 h at 37°C, dermal side down RPMI 1640, supplemented with NaHCO₂ on penicillin/streptomycin/gentamycin, and 0.28 Wunsch units/ml of liberase blendzyme CI (Roche - F. Hoffmann-La Roche Ltd. Basel, Switzerland). The tissues of 5 mice at each time point per group were processed in the presence of 0.05% DNase (Sigma-Aldrich, Steinhein, Germany) using Medimachine (BD Biosciences PharMingen, San Diego, CA) according to the manufacturer's instructions. After processing, cell viability was assessed by Trypan blue exclusion, and the cell count was performed in a Neubauer chamber. For immunofluorescence staining, after cell count, the cells were filtered through a 50-µm filter and then were washed and stained for 20 min at 4°C with the optimal dilution of each Ab. For immunostaining, PE- and FITC-conjugated Abs against CD4, CD8, GR1 and F4/80, and respective isotype controls were employed (BD Biosciences PharMingen). Cells were washed again and analyzed by flow cytometry (FACScan[™] and CELLQuest[™] software; BD Biosciences PharMingen). Results represent the number of cells (±SD) in the periodontal tissues of each mouse, for three independent experiments.

2.5. Quantification of alveolar bone loss

Evaluation of the extent of alveolar bone loss was performed similarly as previously described [25]. The maxillae were hemisected, exposed overnight in 3% hydrogen peroxide and mechanically defleshed. The palatal faces of the molars were photographed with 20X magnification using a dissecting microscope (Leica, Wetzlar, Germany), with the occlusal face of the molars positioned perpendicularly to the base. The images were digitized, and analyzed by an investigator unfamiliar with the project, using ImageTool 2.0 software (The University of Texas Health Science Center, San Antonio). Quantitative analysis comprised the measurement of the area between the cementoenamel junction (CEJ) and the alveolar bone crest (ABC), in arbitrary units of area (AUA), corresponding to the pixels contained in the selected area in the 3 posterior teeth. At each time point, 5 animals were analyzed, and for each animal the alveolar bone loss was defined as the average of CEJ-ABC between the right and the left arch.

2.6. REAL-TIME PCR reactions

Complementary DNA (cDNA) was synthesized using 3 µg of RNA through a reverse transcription reaction (Superscript II, Gibco Life Technologies, Grand Island, NY USA). RealTime-PCR quantitative mRNA analyses were performed in an ABI Prism 7000 Sequence Detection System using the SYBR-green fluorescence quantification system (Applied Biosystems, Warrington, UK) for quantitation of amplicons. The standard PCR conditions were 95°C (10 minutes), and then 40 cycles of 94°C (1 minute), 56°C (1 minute), and 72°C (2 minutes), followed by the standard denaturation curve. The sequences of primers were designed using the PrimerExpress software (Applied Biosystems, Warrington, UK) using nucleotide sequences present in the GenBank database. The primers sequences, the predicted amplicom sizes, the annealing and Melting temperatures are depicted in Table 1. PCR conditions for each target were conscientiously optimized with regard to primer concentration, absence of primer dimer formation, and efficiency of amplification of target genes and housekeeping gene control. SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), 200 nM specific primers, and 2.5 ng of cDNA were used in each reaction. Threshold for positivity of RealTimePCR was determined based in negative controls. The prevalence of subjects from each study group for positive expression of the message for the genes of interest is shown in Table 3. Calculations for determining the relative level of gene expression were made according to the instructions from User's Bulletin (P/N 4303859) from Applied Biosystems, by reference to the beta-actin in the sample, using the cycle threshold (Ct) method. Briefly, Ct is the point at which the exponential increase in signal (fluorescence) crosses a somewhat arbitrary signal level (usually 10 times background). The mean Ct values from duplicate measurements were used to calculate expression of the target gene with normalization to a housekeeping gene used as internal control (beta-actin), using the 2- Δ Ct formula, also according to User's Bulletin. Negative controls without RNA and without reverse transcriptase were also performed. One experiment representative of three

2.7. Protein extraction and cytokine ELISA

Measurements of cytokine in periodontal tissues were performed as previously described (Talvani A et al 2003). For protein extraction, palatal periodontal tissue were homogenized in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4, centrifuged at 1000 rpm at 4 °C and supernatants were stored at -70 °C. The concentrations of cytokines in periodontal extracts were detemined by ELISA using commercially available available kits (all from R&D Systems, Minneapolis, USA), as follows: IL-1b (sensitivity, >3 pg/ml), TNF-a (>3.4 pg/ml), IFN-g (>2 pg/ml),

IL-4 (>2 pg/ml) and IL-10 (>4 pg/ml). All assays were carried out according to the manufacturer's instructions. Results were expressed as picograms of cytokine per milligram of periodontal tissue.

2.8. A. actinomycetemcomitans detection and quantification.

A. actinomycetemcomitans detection was performed as previously described [28]. Periodontal tissue samples were homogenizated in 500 µl of sterile Milli-Q water, and washed twice with sterile Milli-Q water at 12,000 rpm for 10 minutes. The pellet was resuspended in 500 µl of sterile Milli-Q water, and boiled for 10 minutes. After centrifugation (12,000 rpm, 10 minutes) the supernatant was saved and transferred to a new tube and used as template. PCR were them performed in a final volume of 50 µl containing 10 ng of template/sample, 2.5mM MgCl2, 2.5 U of the enzyme Taq polimerase (GIBCO Life Tech), and specific primers at 1µM by using the PTC-100 cycler (MJ Research, Watertown, MA). The amplification products of PCR were separated by electrophoresis on 6% acrylamide gel and visualized as bands by 0.2% silver nitrate staining. RealTimePCR for bacterial quantification were performed using x 50 µl of sample, in the conditions previously described (Sakamoto). The basic conditions of the reaction were 30 cycles for AP-PCR, and 40 cycles for RealTimePCR; of 1 min at 94°C for denaturation, 1 min at 54°C annealing and 2 min at 72°C of extension, plus a final step of extension for 7 min at 72°C. A sample without template DNA and a water sample were used as a negative control.

2.9. Serum CRP measurement.

The levels of serum CRP were determined as previously described (ref POP), using a agglutination commercial kit (Labtest Diagnóstica, São Paulo, Brasil). In brief, 50 ul of serum samples (in dilutions of 4, 16, 64, 128 e 256), 50 ul de NaCI 0,9 g%, and 50 ul of látex beads coated with anti CRP antibodies were dispensed in a 96 well plates. The plate was agitated in circular movements for 2 minutes, and the macroscopic evidence of agglutination was observed. To the semi-quatification of CRP levels, the level of essay sensitivity (>6 mg/L) was multiplied by the titer of CRP of each sample.

2.10. Periodontal tissue MPO activity

The activity of MPO in periodontal tissue was measured as previously described. (Souza et al. 2004). Briefly, periodontal tissue were homogenised in ice cold buffer (0.1 M NaCl, 20 mM NaPO₄, 15 mM Na EDTA), pH 4.7, and centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes. The pellet was then subjected to hypotonic lysis (900 µl of 0.2% NaCl solution followed 30 seconds later by addition of an equal volume of a solution containing 1.6% NaCl and 5% glucose). After further centrifugation, the pellet was resuspended in 50 mM NaPO₄ buffer, pH 5.4, containing 0.5% H-TAB, and re-homogenised. The homogenate was then frozen and thawed three times and centrifuged again at 10 000 rpm for 15 minutes at 4°C. MPO activity in the resuspended pellet was assayed by measuring the change in absorbance at 450 nm using tetramethylbenzidine (1.6 mM) and H₂O₂ (0.5 mM). A unit of MPO activity was defined as that converting 1 µmol of hydrogen peroxide to water in one minute at 22°C.

2.11. Statistical analysis

The inflammatory cells number and the CEJ-ABC area values were submitted to the one-way ANOVA statistical test, followed

by Tukey's post test. Differences in the relative intensity of mRNA expression between the groups were analyzed by the Kruskal-Wallis test and Dunn's post test. Values of P<0.05 were considered statistically significant. All statistical tests were performed with the GraphPad InStat 3.05 and GraphPad Prism 3.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

3. Results

3.1. Modulation of inflammatory reaction and alveolar bone loss

In order to investigate the relevance of TNF-a for PD outcome, we first evaluated their role in the modulation of inflammatory reaction and alveolar bone loss in experimental PD. The analysis of the inflammatory infiltrate extracted from the gingival tissue of AA-infected IFN-KO mice showed a significant decrease in the number of leukocytes at 7, 15, 30 and 60 (P<0.05) days post infection compared to WT-infected mice (fig.1A). In agreement, histological analysis of periodontal tissues showed a significant reduction in the inflammatory reaction in TNF-KO mice (fig1C). Regarding bone resorption. AA-infected TNF-KO mice presented a significant reduction in horizontal bone loss, verified by the decrease in the area between the cement-enamel junction (CEJ) and the alveolar bone crest (ABC) at 15, 30, 45 and 60d (P<0.01) post infection (fig 1B). Sham-infected and non-infected mice of all strains did not present increase in the number of leukocytes in periodontal tissues nor alveolar bone loss in the analyzed period (Fig1A, B).

3.2. Modulation of cytokines in periodontal tissues.

To clarify the mechanisms involved in the down-regulation of PD severity in the absence of TNFp55, we next asked if the differential expression pro- and anti-inflammatory cytokines could account for the modulation of experimental PD (Fig. 02). In TNF-KO infected mice, the expression of IL-1 mRNA was found to be significantly decreased at 7 and 15 days post infection (P<0.05), while at 30 and 60 days pi only a slight reduction was found (fig. 2). We also found a decreased expression of IFN mRNA in the tissues of AA-infected TNF-KO mice, at 7, 15 and 30 days pi (P<0.05), when compared to WT mice. Comparing the levels of IL-12p40 and IL-4 mRNA expression in TNF-KO and WT- AA infected mice, no significant differences were found in the analyzed times (Fig. 02). Our results also demonstrate a significant increase in IL-10 mRNA expression in TNF-KO mice at 7,15, 30 and 60 (P<0.05) days post infection. We also evaluate cytokine production in periodontal tissues by ELISA (data not shown). Our results demonstrate that IL-1b and IFN-g levels were significantly lower in TNF-KO mice at 15 days pi (P<0.05 vs WT). On the other hand, the levels of IL-10 in periodontal tissues of TNF-KO mice were significantly higher than in WT mice 60 days pi (P<0.05 vs WT).

3.3. Modulation of chemokines and chemokine receptors in periodontal tissues.

Since TNFp55-KO mice presented a significant decrease in the inflammatory reaction in periodontal tissues, we also investigated the expression of chemokines and chemokine receptors, considered to be the major factors in the orchestration of cell migration, and potentially involved in the pathogenesis of PD.



Figure 1. Inflammatory reaction and alveolar bone loss in the course of experimental periodontal disease in TNFp55-KO and WT mice. C57Bl/6 and TNFp55-KO mice were inoculated orally with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, periodontal tissue were taken and the inflammatory infiltrate and the alveloar bone level was evaluated. (A) Count of leukocytes extracted from periodontal tissues were performed in a Neubauer chamber (hemacytometer). Values represent one experiment representative of three, analyzed with ONE-WAY ANOVA, Bonferroni post test, (*)P<0.05. (B) Measurements of bone levels were done based in CEJ-ABC in the palatal face of maxillary molars, with ImageToll2.0 software. Infected group presents statistically significant bone loss compared to control and sham-infected groups (B). Values (mean + SD) obtained of 3 animals in each time was analyzed with ONE-WAY ANOVA, Bonferroni post test, (*)P<0.05. Periodontal tissue samples of C57BL/6 (C and E) and TNFp55-KO (D and F) mice inoculated orally with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* were taken before (C and D) and 60 (E and F) days after infection. The periodontal tissues were fixed in paraformaldehyde, demineralized in EDTA solution, and embedded in paraffin. Serial sections (5µm) were cut and histological assessment was carried out following routine hematoxylin and eosin staining. Magnification, X200.).

Our data demonstrate that in TNF-KO infected mice the expression of CXCL3 was found to be significantly decreased at 24h pi, when compared to WT mice (P<0.05). We also found that CXCL1 mRNA expression was reduced at 24h, 7, 15 and 30 days pi (P<0.05 vs WT). Regarding the expression of CXCR2, the receptor of CXCL1-3, our data demonstrate a significant decreased expression at 24h , 7 and 15 days pi (P<0.05 vs WT). Analyzing the expression levels of CCL3, CCL5, CXCL10 and their receptors CCR5 and CXCR3, we found a significant reduction in their expression compared to that seen in WTinfected mice (fig. 2B) (P<0.05 vs WT). When analyzing the expression of Th2 type chemokine CCL1 and their receptor CCR4, no major differences were found between TNF-KO and WT-infected mice (fig), except at 15 days pi, when the expression of CCL1 was found to be significantly higher in TNF-KO mice (P<0.05 vs WT).

3.4. Modulation of tissue MMPs/TIMPs and RANKL/OPG expression.

We next investigated if the lower PD severity in the absence of TNF could be due modulation in the expression of MMPs and RANKL, or in the expression of their respective inhibitors TIMPs and OPG (fig. 3). The quantitative analysis of MMPs (MMP-1, MMP-2 and MMP-9) mRNA expression in gingival tissues from AA infected TNF-KO mice showed a significant lower message when compared to WT-infected mice (fig. 3A) (P<0.05 vs WT). Conversely, the expression of TIMP-1 was found to be increased in TNF-KO at 7 and 15 days pi (fig. 3A) (P<0.05 vs WT), while TIMP-2 expression was higher than in WT mice at 30 and 60 days pi (fig. 3A) (P<0.05 vs WT). We also found that TIMP-3

expression was similar to that seen in WT mice in all the times evaluated (fig. 3A). Investigating the expression of osteclast regulatory factors, we found that RANKL expression was significantly lower in TNF-KO in all the times evaluated (fig. 3A) (P<0.05 vs WT), while OPG expression was increased in TNF-KO mice at 7 and 15 days pi (fig. 3A) (P<0.05 vs WT).

3.5. The role of TNF in the control of experimental AA infection

In spite of the reduced severity of experimental PD, TNF-KO mice does not properly control the experimental AA infection, as observed in the quantitative assessment of the bacterial load in periodontal tissues using RealTimePCR (fig. 4). Our results demonstrate that TNF-KO mice present a significantly higher detection of AA DNA in periodontal tissues at 7, 15, 30 and 60 (fig. 3A) days after infection, when compared to WT mice (P<0.05 vs WT). We also found that AA-infected TNF-KO mice presented an higher acute phase response than WT mice. Our data demonstrate an increased expression of CRP mRNA in the liver of TNF-KO mice (fig. 3A) (P<0.05 vs WT), higher levels of CRP in the serum (fig. 3A) (P<0.05 vs WT) during the course of experimental PD. Regarding sham-infected and non-infected mice, no CRP was detected in serum, nor their mRNA expression was found in liver samples (data not shown). When analyzing the weight of AA infected TNF-KO mice, we found a significant lower weight gain during the course of infection infection, compared to non-infected or sham-infected mice (fig. 3A) (P<0.05 vs WT). Conversely, WT mice infected with AA does not present changes in weight during the course of disease when compared to infected mice.



Figure 2. Real-time PCR analisys of modulation of cytokines in the course of experimental periodontal disease in TNFp55-KO and WT mice. C57Bl/6 and TNFp55-KO mice were inoculated orally with Actinobacillus actinomycetemcomitans, periodontal tissue samples were taken. Total RNA was extracted, and levels of TNF-a, IL-1b, IFN-g, IL-12, IL-4 and IL-10 mRNA were measured quantitatively by the RealTime-PCR SYBR-Green System. The results are presented as the levels of mRNA expression with normalization to beta-actin, using the Ct method. The results (mean + SD) represent values from duplicate measurements from one experiment representative of three. * P<0.05 compared to WT.

3.6. Impaired phagocyte recruitment and activation in periodontal tissues of TNF-KO mice

In order to investigate the reason of the higher susceptibility of TNF-KO to AA infection, we first investigated the phenotype of inflammatory cells extracted from periodontal tissues of TNF-KO



Figure 3. Real-time PCR analisys of modulation of chemokines and chemokine receptors in the course of experimental periodontal disease in TNFp55-KO and WT mice. C57BI/6 and TNFp55-KO mice were inoculated orally with Actinobacillus actinomycetemcomitans, periodontal tissue samples were taken. Total RNA was extracted, and levels of chemokines and chemokine receptors mRNA were measured quantitatively by the RealTime-PCR SYBR-Green System. The results (mean + SD) represent values from duplicate measurements from one experiment representative of three. * P<0.05 compared to WT

mice. Our data demonstrate that the number of GR1+ cells (defined as more than 85% of neutrophils by size and complexity scatter analysis) was lower in TNF-KO mice at 1, 7 and 15 days pi when compared to WT mice (fig. 3A)(P<0.05 vs WT). Our results also demonstrate a significant decrease in the number of F4/80+ cells in the tissues of TNF-KO mice at 7, 15, 30 and 60 days pi when compared to WT mice (fig. 3A)(P<0.05 vs WT). Regarding the number of lymphocytes, we found a significant decrease in the number of CD3+CD4+ (at 7, 15 30 and 60 daus pi) and CD3+CD8+ cells (at 15, 30 and 60 dyas pi) in the periodontal tissues of TNF-KO infected mice (fig. 3A)(P<0.05 vs WT). We also found that the number of CD19+ cells was decreased in periodontal tissues of TNF-KO mice at 30 and 60 days pi (fig. 3A)(P<0.05 vs WT).We next investigated the production of phagocyte antimicrobial mediators, such as iNOS and MPO. Investigating such possibility, we found that the expression of iNOS was reduced in gingival tissues of IFN-KO infected mice compared to WT (fig. 3A)(P<0.05 vs WT). In addition, the levels of MPO were lower in periodontal tissues of TNF-KO AA infected mice at 15 and 60 days pi (fig. 3A)(P<0.05 vs WT).Since antibody humoral immune response was also supposed to present protective roles against periodontopathogens. we also evaluated the levels of specific antibodies in the serum infected mice. However, no differences were found in the levels of IgG AA-specific in the serum of TNF-KO and WT infected mice (data not shown).

4. Discussion

Despite of the clear cause-and-effect relationships demonstrated between TNF-a and the pathogenesis of experimental PD (Assuma, Graves 1998, Graves 2001, Delima), the mechanisms connecting this cytokine to the inflammatory reaction and tissue destruction that take place in periodontal tissues are not known. In addition, their putative role in the control of periodontal infection is unexplored.

In this work, we demonstrated that TNF-a p55 receptor deficient mice (TNF-KO) infected with *A. actinomycetemcomitans* exhibited a significant decrease in both inflammatory reaction and the alveolar bone loss (CEJ-ABC area) compared to AA-infected WT mice. In accordance, previous studies demonstrate that mice lacking TNFp55 present a decrease in both inflammatory reaction and bone loss in response to a wide a range of microbial stimulus and in different pathological process (Kondo S 1997, Peschon JJ 1998, Brito BE 1999, Merkel KD 1999, Abu-Amer 1997, Chiang CY 1999, Azuma Y 2000, Mori L 1996, Campbell IK 2001, Yamaguchi N 2003, Tak PP 1996, Goldring MB 2000).

Our first step in order to clarify the mechanisms by which TNF-a modulates the severity of experimental PD was the evaluation of cytokines that have been implicated in the immunomodulation of disease. We found that in gingival tissues from AA-infected TNF deficient mice the levels of IL-1b were lower during all the course of disease, when compared to WT-infected mice. In fact, IL-1 is a proinflammatory mediator classically associated with PD pathogenesis, and was amply demonstrated that their inhibition ameliorates periodontal conditions (Oates et al 2002, Delima et al 2001, Graves et al 1998, Van Dyke et al 2003, Oringer et al 2002, Harris et al 2002).

We next performed a quantitative assessment of messages encoding for chemokines, chemotactic cytokines supposed to be the main factors involved in the selective recruitment of cell to the periodontal tissues (Mathur et al 1996, Tonetti et al 1994, Gamonal et al 2001, Xiaohui et al 1993, Gemmel et al 2001). We found that the absence of TNFp55 leads to a lower chemokine expression in periodontal tissues in response to AA infection. Our results demonstrate that the messages encoding for neutrophil chemoattractants CXCL1, CXCL3 and their receptor CXCL2 are



Figure 4. Real-time PCR analisys of modulation of MMPs, TIMPs and osteoclast factors in the course of experimental periodontal disease in TNFp55-KO and WT mice. TNFp55-KO and WT mice were inoculated orally with Actinobacillus actinomycetemcomitans, periodontal tissue samples were taken. Total RNA was extracted, and levels of (A) MMP-1, MMP-2, MMP-9, (B) TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, (C) RANKL, OPG and catepsin K mRNA were measured quantitatively by the RealTime-PCR SYBR-Green System. The results are presented as the levels of mRNA expression with normalization to beta-actin, using the Ct method. The results (mean + SD) represent values from duplicate measurements from one experiment representative of three. * P<0.05 compared to WT

diminished in periodontal tissues of TNF-KO mice. In fact, TNF a modulates the production of both chemokines (CXCL1 and CXCL3) and consequently the PMN recruitment (Mizgerd JI 2001 – tnf pneumonia). In agreement, we found that the number of neutrophils in periodontal tissues of TNFp55KO was significantly reduced when compared to WT mice.

Our data also demonstrate that the expression of Th2-type chemokine CCL1 and their receptor CCR4 does not presented significant alterations in the periodontal tissues of TNF-KO mice. On the contrary, the expression of Th1-type chemokines CCL3, CCL5 and CXCL10 and their receptors CCR5 and CXCR3 was significantly lower in TNFp55KO when compared to that seen in WT mice. Such CKs and CKRs are widely expressed in human diseased periodontal tissues (Garlet et al 2003, Gamonal et al 2001, Gemmel et al 2001), and are typically involved in the chemoattraction of Th1 type cells, macrophages and dendritic cells (Rossi & Zlotnik 2000, Luther & Cyster 2001, D'Ambrosio et al 2003, Rot et al 2004, Gerard & Rollins 2001, Weddenburn 2000, Szekanecz et al 2003). In accordance, we found a significant reduction in the number of macrophages, CD4 and CD8 T cells in periodontal tissues of TNFp55KO during all the course of infection.

Besides the CK, adhesion molecules are involved in cell migration process. In this way, we found that ICAM-1 expression was also reduced in periodontal tissues of TNFp55KO. Indeed, and ICAM deficiency attenuates the severity of experimental PD in mice (ref).

Therefore, these broad-spectrum downregulation of chemokines and of ICAM-1 expression could explain the reduction in the inflammatory reaction presented by TNFp55KO mice. In fact, TNF-a and TNFp55 are classically described as regulators of cell migration process in multiple levels, including the regulation of chemokines and adhesion molecules (Sedgwick et al 2000, Vaday et al 2001, Borish & Steinke 2003, Tessier PA 1997, Czermak BJ 1999, Krunkosky TM 2000, Amrani Y 2000, Kondo S 1997). In addition, the downregulation of other pro-inflammatory mediators, such as IL-1b and IFN-g, seen in AA-infected TNF- KO mice, could also contribute to attenuate the expression of inflammatory and Th1-type chemokines (Sedgwick JD et al 2000, Vaday et al 2001, Borish & Steinke 2003, Pryhuber GS 2003, revisão CK, McLoughlin et al 2003, Sebastiani et al 2002, Farber 1997)

In addition to mediate cell migration, TNF-a is potentially involved in the tissue destruction in the course of PD (refs). In this way, we also investigated the expression of MMPs, which regulate turnover of extracellular matrix degradation (Birkedal-Hansen 1993); RANKL, which control osteoclast differentiation and activation; and their respective inhibitors TIMPs and OPG (Teitelbaum 2000, Katagiri & Takahasi 2002). Compared to WT infected mice, the expression of both MMPs and RANKL was significant lower in TNFp55-KO mice. In fact, it was previously demonstrated that p55 is involved in tissue damage driven by MMPs (Taylor DJ 1994, Pender SL 1998, Majka S 2002, Fernandes JC 2002). In addition, TNF-a signaling through the p55 TNF receptor contributes to bone resorption (Abu-Amer Y 1997, Merkel KD 1999, Azuma Y 2000, Gerstenfeld LC 2003), in mechanisms that can be independent (Sabokbar A 2003) or dependent of RANKL (Zou W 2001). On the other hand, the expression of TIMPs (TIMP-1 and TIMP-3) and OPG in periodontal tissues was found to be lower in TNF-KO than in WT mice. Therefore, the expression of IL-10, directly linked to the expression of TIMPs and OPG (Kawashima & Stashenko 1999, Sasaki et al 2000), was also found to be higher in periodontal tissues of TNF-KO infected mice. Our results are also supported by previous findings showing positive correlations between the levels of TNF-a, MMPs and RANKL; and IL-10 and TIMPs and OPG in diseased human periodontal tissues (Garlet et al 2004). In addition, in experimental PD in WT mice, the period of higher TNF-a production is associated with higher levels of MMPs and RANKL expression in periodontal tissues. On the contrary, the raise of IL-10 and IL-4 expression leads to a significant increase in the expression of TIMPs and OPG, leading to the attenuation of disease progression (Garlet et al, unpublished observations). In this context, the downregulation of MMPs and RANKL, and the upregulation of TIMPs and OPG could be mechanist explanation for the significant attenuation in alveolar bone loss in TNFp55KO mice.

However, in spite of the lower PD severity presented by TNFp55 deficient mice, their absence result in a impairment of protective immunity to AA infection. Our results demonstrate that TNF-KO infected mice presented a large increase the bacterial load in periodontal tissue compared to WT mice. In accordance, previous studies demonstrate that mice deficient for TNFp55 present a severe impairment in the clearance a diversity of pathogens and easily succumb to infection (Pfeffer 1993, Thalmaier 2002 IAI, Aliberti, Souto, Mizgerd JI 2001, Zhao YX 1999, Steinshamn S 1996).

In addition, AA-infected TNF-KO presented increased levels of C reactive protein (CRP) in the serum, and a significant reduction in weight gain and during the course of disease. CRP is an acute phase reactant usually found in low levels in the serum of normal individuals, but acute systemic inflammation can elicit higher levels of CRP (Gabay c 1999). Several studies report that increased serum CRP is positively correlated with weight loss, anorexia-cachexia syndrome, and is considered to be an important risk factor for atherosclerosis, myocardial infarction, peripheral vascular disease, and ischemic stroke (Backes JM 2004, Mahmoud FA 2002, Liuzzo G 1994, Ridker PM 1997, YEH MD 2004). In spite of TNF-a being a important mediator of acutephase response (APR), TNFp55 deficient mice exhibited a wildtype APR in response to endotoxin (Leon LR 1997, Ramadori 2001), that can be driven by other inflammatory cytokines such as IL-1 or IL-6 (Ramadori 2001, Labow M 1997, Fantuzzi & Dinarello, 1996, Ramadori 1999, Koj A 1996).

Investigating the reason of the impaired immunity to AA infection, we found that the number of lymphocytes (ie. CD4+T cells, CD8+T cells, B cells) was reduced in the periodontal



Figure 6. Phenotypic analysis of the inflammatory cells harvested from *A. actinomycetemcomitans* infected periodontal tissues. TNFp55-KO and C57BL/6 mice were inoculated orally with *A. actinomycetemcomitans*, tissue samples were taken, and the leukocytes isolated from the inflammatory infiltrate as described in material and methods. The cell viability was assessed by Trypan blue exclusion, and PE- and FITC-conjugated Abs specific to (A) CD4, (B) CD8, (C) GR1, (D) F4/80, and respective control isotypes were employed and analyzed by flow cytometry. The levels of (D) iNOS expression and (E) MPO in periodontal tissues were also determined. The results (mean + SD) represent values from duplicate measurements from one experiment representative of three. * P<0.05 compared to WT.

tissues of TNF-KO mice. The local accumulation of B cells is supposed to contribute to the production of antibodies, which in their turn could play a role in the control of infection. However, the serum levels of AA specific antibodies was not altered by the absence of TNFp55. Besides B cells, the presence of T cells may be important in the orchestration of the local immune response, trough the production of cytokines that activate and amplificate innate immune response.

In addition, our results demonstrate a reduced recruitment of both phagocytes granolocytes (PMNs - GR1 positive cells) and macrophages (F4/80 positive cells) to the periodontal tissues of TNF-KO mice (fig X). Both cell types are part of the innate immune response, and are directly involved in the control killing of infectious agents through the production of antimicrobial reactants. In mice, macrophages are the primary source of NO, a highly reactive anti-microbial radical, which is derived from arginine and molecular oxygen in a reaction, catalyzed by inducible nitric oxide synthase (iNOS)(Bogdan 2001, Chakravortty & Hensel 2003, Bogdan et al 2000). Indeed, TNF-a can drive activation of macrophages and microbicidal activity (Souto, Silva JS 1995, Leenen PJ 1994, Zhao YX 1999). In their turn, PMNs have been demonstrated to also release NO and several other antimicrobial oxygen reactives, such as MPO and O2 (Asai et al 2000, Carreras et al 1994, Sethi & Dishit 2000, Xie et al 1992, Zhao YX 1999). In fact, we found that both MPO production and the expression of inducible NOS (iNOS) were significantly reduced in gingival tissues of TNF-KO mice. Indeed, complementary action between both oxygen and nitrogen reactives systems has been demonstrated, since mice deficient of both NO and O_2^- quickly succumb to infections by endogenous bacteria (Shiloh et al 1999, Zhao YX 1999). Taken together, our results suggest that the lower number of leukocytes in periodontal tissues may be result of the lower levels of CK expressed in these tissue in absence of TNFp55.

Our results provide data clarifying the molecular mechanisms involved in the control of inflammatory reaction and alveolar bone loss, and therefore, in the determination PD severity. In addition, we demonstrated an essential role of TNF-a in provide immune protection to *Actinobacilus actinomycetemcomitans* periodontal infection. Such protection is possibly exerted by the functional interplay between the chemoattraction of lymphocytes and the production of antimicrobial reactants by the phagocytes in periodontal tissues.

Together, these results contribute to the understanding of the role of TNF in the genesis and regulation of inflammatory reactions in the outcome of experimental periodontal disease. Such knowledge might allow us to develop preventive and therapeutical strategies to control the inflammatory process, to improve the removal of microorganisms and to promote the repair of tissues, while limiting damage.

Interestingly, in these same time periods we found remarkable differences in the rate of disease progression. From infection until 30d, there was a marked increase in both inflammatory cell number and bone loss. In contrast, after 30 days of infection, a stable number of inflammatory cells in periodontal tissue and a lower rate of alveolar bone loss were found. These data suggests that the balance of MMPs and TIMPs expression could account for the different degrees of disease progression. In fact, the increased expression of MMPs in diseased periodontal tissues seems to be consensus in the literature, and is thought to account for the destruction of connective and bone tissues (Birkedal-Hansen 1993, Aiba et al 1996, Ingman et al 1996, Ramamurthy et al 2002, Delaisse 2003, Garlet et al 2004). However, data regarding the expression of TIMPs in healthy versus diseased periodontal tissues is contradictory. Some studies show a decrease in the levels of TIMPs in diseased periodontal tissues, supporting the idea that an imbalance in the levels of TIMPs/MMPs takes place in PD and results in tissue destruction (Alexander & Damoulis 1994, Soell et al 2002, Tuter et al 2002). Conversely, other studies detected an increased expression of TIMPs in diseased periodontal tissues (Alpagot et al 2001, Nomura et al 1998, Haerian et al 1995, Garlet et al 2004), which could reflect an attempt to maintain the tissue homeostasis, in the view of the increased expression of MMPs. However, such upregulation of TIMPs may not be enough to compensate for the even higher upregulation of MMPs, and such imbalance would result in periodontal destruction. In accordance, imbalances in the MMPs/TIMPs system (i.e., lower levels of TIMPs and/or higher levels of MMPs) are involved in the pathogenesis of several diseases (Schulze et al 2003, Lanchou et al 2003, Gianelli et al 2002), including rheumatoid arthritis (Golbach et al 2000, Yoshihara et al 2000, Katrib et al 2003, Kong et al 1999, Romas et al 2002), which share several features with PD, including the chronic nature of the inflammatory reaction and tissue destruction activity (Mercado et al 2003).

In addition to the tissue destruction mediated by MMPs, the alveolar bone resorption driven by osteoclasts is another key feature of PD. In view of this, we also examined the expression of the osteoclastogenic factors RANKL, its inhibitor, OPG; and catepsin K, a key enzyme in bone resorption process (Teitelbaum 2000, Delaise 2003). In a similar pattern to that seem to MMPs/TIMPs, we found that the initial phase of PD, presenting higher / faster disease progression, is associated with high catepsin K and RANKL expression and low OPG expression. On the contrary, lower catepsin K and RANKL and higher OPG expression was found in the late period/stage of PD, characterized by lower disease activity. Our data suggests that RANKL/OPG balance determine the rate of bone loss and PD progression. Such hypothesis is supported by data showing that RANKL is closely associated with bone resorption (Teitelbaum 2000, Ritchlin et al 2003), and the blockade of RANKL by OPG leads to a reduction in the alveolar bone loss (Liu et al 2003, Teng et al 2000). In accordance, the balance in RANKL/OPG is supposed to account for modulation of human PD severity (Crotti et al 2003, Mogi 2004, Garlet et al 2004).

Since the balance of both MMPs/TIMPs and RANKL/OPG is supposed to be determined by cytokine profile, we next used RealTimePCR and ELISA to investigated the cytokines which could regulate the expression of such factors (Teitelbaum 2000, Birkedal-Hansen et al 1993, Nakamura I 2003, Saidenberg Kermanac'h 2002). We found that both mRNA and protein levels of TNF- α , IL-1 β and IFN- γ , were found in high levels from 24h until 15 days and significantly decreased after 30 days of infection, and presented positive correlation with the expression of MMPs and RANKL. Conversely, IL-4 and IL-10 were found in significantly levels only at 30 and 60 days of infection, was positively correlated with the expression of TIMPs and OPG.

These data support our previous findings, showing that the balance in the expression of MMPs/TIMPs and of RANKL/OPG in PD could be due the different patterns of cytokines produced in the tissues (Garlet et al, 2004). In fact, IL-1 and TNF are proinflammatory stimuli that clearly trigger deleterious events which occur in periodontal disease, including the stimulation of matrix metalloproteinase production and bone resorption (Graves DT 2003, Teitelbaum 2000, Birkedal-Hansen et al 1993, Nakamura I 2003).

Despite controversies regarding the role of T helper cytokines in periodontal diseases, Th1 and Th2 cytokines have been shown to be associated with activation and suppression of bone resorption, respectively (Kawashima & Stashenko 1999, Sasaki et al 2000, Kawai et al 2000, Eastcott et al 1994). IFN-y appears to be the predominant cytokine produced by T cells in PD, and an increase in IFN-y-producing cells in the lesions is correlated with the progression of disease (Ukai et al 2001, Roberts et al 1997, Kawai 2000). In contrast, Th2 cytokines (IL-4 and IL-10) are widely expressed in diseased periodontal tissues (Lappin et al 2001, Tokoro et al 1997, Garlet et al 2004) and are associated with suppression of bone resorption (Eastcott 1994, Kawashima & Stashenko 1999, Sasaki et al 2000). Moreover, recent studies have been demonstrated that mixed patterns of immune response are present in diseased periodontal tissues (Berghlund et al 2003, Garlet et al 2003, Teng 2002, Ukai et al 2001), suggesting that the balance of T helper responses could account for the control of disease severity trough the regulation of MMPs/TIMPs and RANKL/OPG systems (Garlet et al 2004, Mogi 2004, Yamazaki 2004, Valverde 2004).

Taken together, our results suggest that higher disease progression is associated with enhanced expression of MMPs and RANKL, that could be induced by TNF- α , IL-1b and/or IFN- γ . In addition, the increased expression of TIMPs and OPG, possibly induced by IL-4 and/or IL-10, could be responsible for the attenuation of the tissue destruction. Therefore, the knowledge regarding the role of the cytokines in the modulation of MMPs/TIMPs and RANKL/OPG systems, and their relevance to the outcome of PD may provide the basis for future therapeutical interventions, in order to limiting the inflammatory process while improve rapid repair of periodontal tissues.

5. Acknowledgements

This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP #0109998-7 (scholarship to G.P.G.) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (scholarship to J.S.S.).

6. References

Amar, S., T. Van Dyke, H. Eugster, N. Schultze, P. Koebel, and H. Bluethmann. 1995. TNF-induced cutaneous necrosis is mediated by tumor necrosis factor receptor R1. J. Inflamm. 47:180-186

Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves D. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. J Immunol 1998;160:403-409.

B.J. Czermak et al., In vitro and in vivo dependency of chemokine generation on C5a and TNF-. J. Immunol. 162 (1999), pp. 2321–2325.

Brennan FM, Browne KA, Green PA, Jaspar JM, Maini RN, Feldmann M. Reduction of serum matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 3 in rheumatoid arthritis patients following anti-tumour necrosis factor-alpha (cA2) therapy. Br J Rheumatol1997;36:643– 50.[Medline]

Delima A, Oates T, Assuma R, et al. Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. J Clin Periodontol 2001;28:233-240. Dinarello C. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000;188:503-508.

Fantuzzi G, Dinarello CA. The inflammatory response in interleukin-1 beta-deficient mice: comparison with other cytokine-related knock-out mice. J Leukoc Biol 1996; 59: 489-493.

Feghali C, Wright T. Cytokines in acute and chronic inflammation. Front Biosci 1997;2:d12-26.

Ferrante A. Activation of neutrophils by interleukins-1 and -2 and tumor necrosis factors. *Immunol Ser* 1992;57:417-436.

Frevert, C. W., A. Farone, H. Danaee, J. D. Paulauskis, L. Kobzik. 1995. Functional characterization of rat chemokine macrophage inflammatory protein-2. Inflammation 19:133

Frevert, C. W., S. Huang, H. Danaee, J. D. Paulauskis, L. Kobzik. 1995. Functional characterization of the rat chemokine KC and its importance in neutrophil recruitment in a rat model of pulmonary inflammation. J. Immunol. 154:335.

Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. N Engl J Med. 1999; 340: 448-454.[Free Full Text]

Goto T, Yamaza T, Tanaka T. Cathepsins in the osteoclast.J Electron Microsc (Tokyo). 2003;52(6):551-8.

Graves D, Chen C, Douville C, Jiang Y. Interleukin-1 receptor signaling rather than that of tumor necrosis factor is critical in protecting the host from the severe consequences of a polymicrobe anaerobic infection. *Infect Immun* 2000;8:4746-4751.

Graves D, Delima A, Assuma R, Amar S, Oates T, Cochran D. Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis. J Periodontol 1998;69:1419-1425.

Graves D, Oskoui M, Volejnikova S, et al. Tumor necrosis factor modulates fibroblast apoptosis, PMN recruitment, and osteoclast formation in response to P. gingivalis infection. J Dent Res 2001;80:1875-1879.

Henderson B. Cytokine and proteinase inhibitors in the modulation of connective tissue destruction in rheumatoid arthritis. *Clin Immunother* 1994;2:167-174.

Ishiguro N, Ito T, Obata K, Fujimoto N, Iwata H. Determination of stromelysin-1, 72 and 92 kDa type IV collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-2 in synovial fluid and serum from patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol1996;23:1599–604.

Jiang Y, Magli L, Russo M. Bacterium-dependent induction of cytokines in mononuclear cells and their pathologic consequences in vivo. Infect Immun 1999;67:2125-2130.

Koj A. Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. Biochim Biophys Acta. 1996 Nov 15;1317(2):84-94.

Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T. et al. Impaired immune and acute phase responses in interleukin-6-deficient mice. Nature 1994; 368: 339-342.

Labow M, Shuster D, Zetterstrom M, Nunes P, Terry R, Cullinan EB. *et al.* Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. J Immunol 1997; 159: 2452-2461.

Leon LR, Kozak W, Peschon J, Kluger MJ. Exacerbated febrile responses to LPS, but not turpentine, in TNF double receptor-knockout mice. Am J Physiol 1997; 272: R563-569.

Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, et al. The prognostic value of Creactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. N Engl J Med. 1994; 331: 417–424.[Abstract/Free Full Text]

Mori R, Kondo T, Ohshima T, Ishida Y, Mukaida N. Accelerated wound healing in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice with reduced leukocyte infiltration. FASEB J. 2002 Jul;16(9):963-74.

Nakamura I, Rodan GA, Duong le T. Regulatory mechanism of osteoclast activation. J Electron Microsc (Tokyo). 2003;52(6):527-33.

Offenbacher S, Odle B, Braswell L, et al. Changes in cyclooxygenase metabolites in experimental periodontitis in Macaca mulatta. J Periodont Res 1989;24:63-74.

P.A. Tessier et al., Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha. J. Immunol. 159 (1997), pp. 3595–3602.

Peschon, J., D. Torrance, K. Stocking, M. Glaccum, C. Otten, C. Willis, K. Charrier, P. Morrissey, C. Ware, and K. Mohler. 1998. TNF receptordeficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. J. Immunol. 160:943-952

Pfeffer, K., T. Matsuyama, T. M. Kündig, A. Wakeham, K. Kishihara, A. Shahinian, K. Wiegmann, P. S. Ohashi, M. Krönke, and T. W. Mak. 1993. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *Listeria monocytogenes* infection. Cell 73:457-467

R.M. Ransohoff and M. Tani, Do chemokines mediate leukocyte recruitment in post-traumatic CNS inflammation. Trends Neurosci. 21 (1998), pp. 154–159.

Ramadori G, Christ B. Cytokines and the hepatic acute-phase response. Semin Liver Dis. 1999;19(2):141-55.

Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, et al. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. N Engl J Med. 1997; 336: 973–979. [Abstract/Free Full Text]

Rodan G, Martin T. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 2000;289:1508-1514.

Tak PP, Taylor PC, Breedveld FC et al. Decrease in cellularity and expression of adhesion molecules by anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody treatment in patients with rheumatoid arthritis [see comments]. Arthritis Rheum1996;39:1077–81.[Medline]

Ulfgren AK, Andersson U, Engstrom M, Klareskog L, Maini RN, Taylor PC. Systemic anti-tumor necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis down-regulates synovial tumor necrosis factor alpha synthesis. Arthritis Rheum2000;43:2391–6.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

NY ARS IN STRANDSOND THY IN BAR IS STOR

The second s

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS AK, MURPHY KM, SHER A. Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature. 1996 Oct 31;383(6603):787-93.
- ABE T, ARAI T, OGAWA A, HIROMATSU T, MASUDA A, MATSUGUCHI T, NIMURA Y, YOSHIKAI Y. Kupffer cell-derived interleukin 10 is responsible for impaired bacterial clearance in bile duct-ligated mice. Hepatology. 2004 Aug;40(2):414-23.
- ABU-AMER Y, ROSS FP, EDWARDS J, TEITELBAUM SL. Lipopolysaccharide-stimulated osteoclastogenesis is mediated by tumor necrosis factor via its P55 receptor. J Clin Invest. 1997 Sep 15;100(6):1557-65.
- ACHONG R, NISHIMURA I, RAMACHANDRAN H, HOWELL TH, FIORELLINI JP, KARIMBUX NY. Membrane type (MT) 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 expression in ligature-induced periodontitis in the rat. J Periodontol. 2003 Apr;74(4):494-500.
- AGNELLO D, LANKFORD CS, BREAM J, MORINOBU A, GADINA M, O'SHEA JJ, FRUCHT DM. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. J Clin Immunol. 2003 May;23(3):147-61.
- AIBA T, AKENO N, KAWANE T, OKAMOTO H, HORIUCHI N. Matrix metalloproteinases-1 and -8 and TIMP-1 mRNA levels in normal and diseased human gingivae. Eur J Oral Sci. 1996 Oct-Dec;104(5-6):562-9.
- ALCAMO E, MIZGERD JP, HORWITZ BH, BRONSON R, BEG AA, SCOTT M, DOERSCHUK CM, HYNES RO, BALTIMORE D. Targeted mutation of TNF receptor I rescues the RelA-deficient mouse and reveals a critical role for NF-kappa B in leukocyte recruitment. J Immunol. 2001 Aug 1;167(3):1592-600.
- ALEXANDER MB, DAMOULIS PD. The role of cytokines in the pathogenesis of periodontal disease. Curr Opin Periodontol. 1994:39-53.
- ALIBERTI JC, SOUTO JT, MARINO AP, LANNES-VIEIRA J, TEIXEIRA MM, FARBER J, GAZZINELLI RT, SILVA JS. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during Trypanosoma cruzi infection. Am J Pathol. 2001 Apr;158(4):1433-40.
- ALLAKER RP, SILVA MENDEZ LS, HARDIE JM, BENJAMIN N. Antimicrobial effect of acidified nitrite on periodontal bacteria. Oral Microbiol Immunol. 2001 Aug;16(4):253-6.
- ALPAGOT T, BELL C, LUNDERGAN W, CHAMBERS DW, RUDIN R. Longitudinal evaluation of GCF MMP-3 and TIMP-1 levels as prognostic factors for progression of periodontitis. J Clin Periodontol. 2001 Apr;28(4):353-9.
- AL-RASHEED A, SCHEERENS H, SRIVASTAVA AK, RENNICK DM, TATAKIS DN. Accelerated alveolar bone loss in mice lacking interleukin-10: late onset. J Periodontal Res. 2004 Jun;39(3):194-8.
- AMAR S, VAN DYKE TE, EUGSTER HP, SCHULTZE N, KOEBEL P, BLUETHMANN H. Tumor necrosis factor (TNF)-induced cutaneous necrosis is mediated by TNF receptor 1. J Inflamm. 1995-96;47(4):180-9.
- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY The pathogenesis of periodontal diseases. J Periodontol.;70(4):457-70, 1999.
- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. 1999 International Workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. Annals of Periodontol.;4(1):7-37,1999.
- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Consensus report : epidemiology and diagnosis . Ann Peridontol, 216-222, 1996.

- ANDERSSON A, KOKKOLA R, WEFER J, ERLANDSSON-HARRIS H, HARRIS RA. Differential macrophage expression of IL-12 and IL-23 upon innate immune activation defines rat autoimmune susceptibility. J Leukoc Biol. 2004 Dec;76(6):1118-24.
- ARAMAKI M, NAGASAWA T, KOSEKI T, ISHIKAWA I. Presence of activated B-1 cells in chronic inflamed gingival tissue. J Clin Immunol. 1998 Nov;18(6):421-9.
- ASAI K, KATO H, HIROSE K, AKAOGI K, KIMURA S, MUKAI S, INOUE M, YAMAMURA Y, SANO H, SUGINO S, YOSHIKAWA T, KONDO M. PSK and OK-432-induced immunomodulation of inducible nitric oxide (NO) synthase gene expression in mouse peritoneal polymorphonuclear leukocytes and NOmediated cytotoxicity. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2000 May;22(2):221-35.
- ASSUMA R, OATES T, COCHRAN D, AMAR S, GRAVES DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. J Immunol., 160(1):403-409, 1998.
- ATTSTROM R. The roles of gingival ehpithelium and phagocytosing leukocytes in gingival defence. J Clin Periodontol., 2:25, 1975.
- AVILA-CAMPOS MJ, CARVALHO MA, ZELANTE F. Distribution of biotypes and antimicrobial susceptibility of Actinobacillus actinomycetemcomitans. Oral Microbiol Immunol. 1995 Dec;10(6):382-4.
- BACKES JM, HOWARD PA, MORIARTY PM. Role of C-reactive protein in cardiovascular disease. Ann Pharmacother. 2004 Jan;38(1):110-8.
- BAECHER-ALLAN C, VIGLIETTA V, HAFLER DA. Human CD4+CD25+ regulatory T cells. Semin Immunol. 2004 Apr;16(2):89-98.
- BAGGIOLINI M, DEWALD B, MOSER B. Human chemokines: na update. Annu. Rev. Immunol., 15: 675-705, 1997.
- BAKER AH, EDWARDS DR, MURPHY G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. J Cell Sci. 2002 Oct 1;115(Pt 19):3719-27.
- BAKER PJ, DIXON M, EVANS RT, DOFOUR L, JOHNSON E, ROOPENIAN DC. CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. Infect Immun.,67(6):2804-2809, 1999.
- BAKER, PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. Microbes Infect 2000;2:1181-1192.
- BARTOVA J, KRATKA-OPATRNA Z, PROCHAZKOVA J, KREJSA O, DUSKOVA J, MRKLAS L, TLASKALOVA H, CUKROWSKA B.. Th1 and Th2 cytokine profile in patients with early onset periodontitis and their healthy siblings. Mediators Inflamm., 9;2:115-120, 2000.
- BASTOS KR, MARINHO CR, BARBOZA R, RUSSO M, ALVAREZ JM, D'IMPERIO LIMA MR. What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells? Microbes Infect. 2004 May;6(6):630-636.
- BATISTA AC, SILVA TA, CHUN JH, LARA VS. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. Oral Dis. 2002 Sep;8(5):254-60.
- BEHLING UH, SALLAY C, SANAVI F, PHAM PH, NOWOTNY A. Humoral immunity and reduced periodontal bone loss in Eikenella corrodens-monoassociated rats. Infect Immun. 1981 Sep;33(3):801-5.
- BELKAID Y, PICCIRILLO CA, MENDEZ S, SHEVACH EM, SACKS DL.. CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. Nature, 420: 502-507. 2002.

- BENDIXEN AC, SHEVDE NK, DIENGER KM, WILLSON TM, FUNK CD, PIKE JW. IL-4 inhibits osteoclast formation through a direct action on osteoclast precursors via peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Feb 27;98(5):2443-8.
- BERGLUNDH T, LILJENBERG B, LINDHE J. Some cytokine profiles of T-helper cells in lesions of advanced periodontitis. J Clin Periodontol. 2002 Aug;29(8):705-9.
- BESSIS N, BOISSIER MC. Novel pro-inflammatory interleukins: potential therapeutic targets in rheumatoid arthritis. Joint Bone Spine. 2001 Dec; 68(6): 477-81.
- BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. J Periodontal Res.;28(6 Pt 2):500-10, 1993.
- BIRKEDAL-HANSEN H, MOORE WG, BODDEN MK, WINDSOR LJ, BIRKEDAL-HANSEN B, DECARLO A, ENGLER JA. Matrix metalloproteinases: a review. Crit Rev Oral Biol Med. 1993;4(2):197-250.
- BJORNSSON MJ, HAVEMOSE-POULSEN A, STOLTZE K, HOLMSTRUP P. Influence of the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) on periodontal bone destruction in Sprague-Dawley rats. J Periodontal Res. 2004 Aug;39(4):269-74.
- BLIX IJ, HELGELAND K. LPS from Actinobacillus actinomycetemcomitans and production of nitric oxide in murine macrophages J774. Eur J Oral Sci 1998 Feb;106(1):576-81.
- BOGDAN C, ROLLINGHOFF M, DIEFENBACH A. The role of nitric oxide in innate immunity. Immunol Rev. 2000 Feb; 173: 17-26.
- BOGDAN C. Nitric oxide and the immune response.Nat Immunol. 2001 Oct; 2(10): 907-16.
- BOMBINI G, CANETTI C, ROCHA FA, CUNHA FQ. Tumour necrosis factor-alpha mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. Eur J Pharmacol. 2004 Aug 2;496(1-3):197-204.
- BORISH LC, STEINKE JW. Cytokines and chemokines. J Allergy Clin Immunol. 2003 Feb; 111(2 Suppl): S460-75.
- BRITO BE, O'ROURKE LM, PAN Y, ANGLIN J, PLANCK SR, ROSENBAUM JT. IL-1 and TNF receptordeficient mice show decreased inflammation in an immune complex model of uveitis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999 Oct;40(11):2583-9.
- BRODBECK WG, SHIVE MS, COLTON E, ZIATS NP, ANDERSON JM. Interleukin-4 inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced and spontaneous apoptosis of biomaterial-adherent macrophages. J Lab Clin Med. 2002 Feb;139(2):90-100.
- BROMBACHER F, KASTELEIN RA, ALBER G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. Trends Immunol. 2003 Apr; 24(4): 207-12.
- BRUBAKER JO, MONTANER LJ. Role of interleukin-13 in innate and adaptive immunity. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2001 Jun;47(4):637-51.
- BUTLER DM, MALFAIT AM, MAINI RN, BRENNAN FM, FELDMANN M. Anti-IL-12 and anti-TNF antibodies synergistically suppress the progression of murine collagen-induced arthritis. Eur J Immunol. 1999 Jul; 29(7): 2205-12
- CARRERAS MC, PARGAMENT GA, CATZ SD, PODEROSO JJ, BOVERIS A. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. FEBS Lett. 1994 Mar 14;341(1):65-8.

- CESAR NETO JB, DE SOUZA AP, BARBIERI D, MORENO H JR, SALLUM EA, NOCITI FH JR. Matrix metalloproteinase-2 may be involved with increased bone loss associated with experimental periodontitis and smoking: a study in rats. J Periodontol. 2004 Jul;75(7):995-1000.
- CHAKRABORTI S, MANDAL M, DAS S, MANDAL A, CHAKRABORTI T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. Mol Cell Biochem. 2003 Nov;253(1-2):269-85.
- CHAKRAVORTTY D, HENSEL M. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. Microbes Infect. 2003 Jun; 5(7): 621-7.
- CHEN AC, LIU CC, YAO WJ, CHEN CT, WANG JY. Actinobacillus actinomycetemcomitans pneumonia with chest wall and subphrenic abscess. Scand J Infect Dis. 1995;27(3):289-90.
- CHENG X, KINOSAKI M, MURALI R, GREENE MI. The TNF receptor superfamily: role in immune inflammation and bone formation. Immunol Res. 2003;27(2-3):287-94.
- CHIANG CY, KYRITSIS G, GRAVES DT, AMAR S. Interleukin-1 and tumor necrosis factor activities partially account for calvarial bone resorption induced by local injection of lipopolysaccharide. Infect Immun. 1999 Aug;67(8):4231-6.
- CHIKANO S, SAWADA K, SHIMOYAMA T, KASHIWAMURA SI, SUGIHARA A, SEKIKAWA K, TERADA N, NAKANISHI K, OKAMURA H. IL-18 and IL-12 induce intestinal inflammation and fatty liver in mice in an IFN-gamma dependent manner. Gut. 2000 Dec;47(6):779-86.
- CLARK RA, LEIDAL KG, TAICHMAN NS. Oxidative inactivation of Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxin by the neutrophil myeloperoxidase system. Infect Immun. 1986 Aug;53(2):252-6.
- CLARK WB, MAGNUSSON I, BEEM JE, JUNG JM, MARKS RG, MCARTHUR WP. Immune modulation of Prevotella intermedia colonization in squirrel monkeys. Infect Immun. 1991 Jun;59(6):1927-31.
- COCCIA EM, STELLACCI E, MARZIALI G, WEISS G, BATTISTINI A. IFN-gamma and IL-4 differently regulate inducible NO synthase gene expression through IRF-1 modulation. Int Immunol. 2000 Jul;12(7):977-85.
- COOPER AM, ADAMS LB, DALTON DK, APPELBERG R, EHLERS S. IFN-gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. Trends Microbiol. 2002 May; 10(5): 221-6.
- CORRY DB, KHERADMAND F. Biology and therapeutic potential of the interleukin-4/interleukin-13 signaling pathway in asthma. Am J Respir Med. 2002;1(3):185-93. Review.
- CRAIG RG, YIP JK, SO MK, BOYLAN RJ, SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD. Relationship of destructive periodontal disease to the acute-phase response. J Periodontol. 2003 Jul;74(7):1007-16.
- CROTTI T, SMITH MD, HIRSCH R, SOUKOULIS S, WEEDON H, CAPONE M, AHERN MJ, HAYNES D. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. J Periodontal Res. 2003 Aug;38(4):380-7.
- CUROTTO DE LAFAILLE MA, LAFAILLE JJ. CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. Curr Opin Immunol. 2002 Dec;14(6):771-8.
- CUTLER CW, STANFORD TW, ABRAHAM C, CEDERBERG RA, BOARDMAN TJ, ROSS C. Clinical benefits of oral irrigation for periodontitis are related to reduction of pro-inflammatory cytokine levels and plaque. J Clin Periodontol. 2000 Feb;27(2):134-43.
- CUZZOCREA S, MAZZON E, DUGO L, SERRAINO I, BRITTI D, DE MAIO M, CAPUTI AP. Absence of endogeneous interleukin-10 enhances the evolution of murine type-II collagen-induced arthritis. Eur Cytokine Netw. 2001 Oct-Dec;12(4):568-80.
- CZERMAK BJ, SARMA V, BLESS NM, SCHMAL H, FRIEDL HP, WARD PA. In vitro and in vivo dependency of chemokine generation on C5a and TNF-alpha. J Immunol. 1999 Feb 15;162(4):2321-5.

- DAGHIGH F, BORGHAEI RC, THORNTON RD, BEE JH. Human gingival fibroblasts produce nitric oxide in response to proinflammatory cytokines. J Periodontol. 2002 Apr;73(4):392-400
- DAHAN M, NAWROCKI B, ELKAIM R, SOELL M, BOLCATO-BELLEMIN AL, BIREMBAUT P, TENENBAUM H. Expression of matrix metalloproteinases in healthy and diseased human gingiva. J Clin Periodontol. 2001 Feb;28(2):128-36.
- D'AIUTO F, READY D, TONETTI MS. Periodontal disease and C-reactive protein-associated cardiovascular risk. J Periodontal Res. 2004 Aug;39(4):236-41.
- D'AMBROSIO D, IELLEM A, BONECCHI R, MAZZEO D, SOZZANI S, MANTOVANI A, SINIGAGLIA F. Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. J Immunol.;161(10):5111-5115,1998.
- D'AMBROSIO D, PANINA-BORDIGNON P, SINIGAGLIA F. Chemokine receptors in inflammation: an overview. J Immunol Methods. 2003 Feb; 273(1-2): 3-13
- DAYER JM, BURGER D. Interleukin-1, tumor necrosis factor and their specific inhibitors. Eur Cytokine Netw. 1994 Nov-Dec; 5(6): 563-71.
- DEAN DD, MARTEL-PELLETIER J, PELLETIER JP, HOWELL DS, WOESSNER JF JR. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. J Clin Invest. 1989 Aug;84(2):678-85.
- DECKER T, STOCKINGER S, KARAGHIOSOFF M, MULLER M, KOVARIK P. IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. J Clin Invest. 2002 May; 109(10): 1271-7.
- DEL FABBRO M, FRANCETTI L, PIZZONI L, WEINSTEIN RL. Congenital neutrophil defects and periodontal diseases. Minerva Stomatol 2000 49; 6:293-311.
- DELAISSE JM, ANDERSEN TL, ENGSIG MT, HENRIKSEN K, TROEN T, BLAVIER L. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. Microsc Res Tech. 2003 Aug 15;61(6):504-13.
- DELAISSE JM, ENGSIG MT, EVERTS V, DEL CARMEN OVEJERO M, FERRERAS M, LUND L, VU TH, WERB Z, WINDING B, LOCHTER A, KARSDAL MA, TROEN T, KIRKEGAARD T, LENHARD T, HEEGAARD AM, NEFF L, BARON R, FOGED NT. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. Clin Chim Acta. 2000 Feb 15; 291(2): 223-34.
- DELALEU N, BICKEL M. Interleukin-1 beta and interleukin-18: regulation and activity in local inflammation. Periodontol 2000. 2004;35:42-52.
- DELIMA AJ, OATES T, ASSUMA R, SCHWARTZ Z, COCHRAN D, AMAR S, GRAVES DT. Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. J Clin Periodontol. 2001 Mar; 28(3): 233-40.
- DINARELLO C. Proinflammatory cytokines. Chest 2000;188:503-508.
- DINARELLO CA. The pathophysiology of the pro-inflammatory cytokines. Biotherapy. 1990;2(3):189-91.
- DONNELLY RP, FENTON MJ, FINBLOOM DS, GERRARD TL. Differential regulation of IL-1 production in human monocytes by IFN and IL-4. J Immunol.;145(2):569-75,1990.
- EASTCOTT JW, YAMASHITA K, TAUBMAN MA, HARADA Y, SMITH DJ. Adoptive transfer of cloned T helper cells ameliorates periodontal disease in nude rats. Oral Microbiol Immunol.;9(5):284-289,1994.
- EBERSOLE JL, CAPPELLI D, HOLT SC. Periodontal diseases: to protect or not to protect is the question? Acta Odontol Scand. 2001 Jun;59(3):161-6.

- EBERSOLE JL, CAPPELLI D. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. Periodontol 2000. 2000 Jun;23:19-49.
- EBERSOLE JL, TAUBMAN MA. The protective nature of host responses in periodontal diseases. Periodontol 2000;5:112-141,1994.
- EBERSOLE JL. Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. Periodontol 2000. 2003;31:135-66.
- EHRENSTEIN MR, EVANS JG, SINGH A, MOORE S, WARNES G, ISENBERG DA, MAURI C. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. J Exp Med. 2004 Aug 2;200(3):277-85.
- EJEIL AL, IGONDJO-TCHEN S, GHOMRASSENI S, PELLAT B, GODEAU G, GOGLY B. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingiva. J Periodontol. 2003 Feb;74(2):188-95.
- ELLIS TN, BEAMAN BL. Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function. Immunology. 2004 May;112(1):2-12.
- EMINGIL G, ATILLA G, SORSA T, LUOTO H, KIRILMAZ L, BAYLAS H. The effect of adjunctive lowdose doxycycline therapy on clinical parameters and gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels in chronic periodontitis. J Periodontol. 2004 Jan;75(1):106-15.
- ENGEBRETSON SP, LAMSTER IB, HERRERA-ABREU M, CELENTI RS, TIMMS JM, CHAUDHARY AG, DI GIOVINE FS, KORNMAN KS. The influence of interleukin gene polymorphism on expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in periodontal tissue and gingival crevicular fluid. J Periodontol. 1999 Jun;70(6):567-73.
- FANTUZZI G, DINARELLO CA. The inflammatory response in interleukin-1 beta-deficient mice: comparison with other cytokine-related knock-out mice. J Leukoc Biol 1996; 59: 489-493.
- FARBER JM. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. J Leukoc Biol. 1997 Mar;61(3):246-57.
- FASSMANN A, HOLLA LI, BUCKOVA D, VASKU A, ZNOJIL V, VANEK J. Polymorphisms in the +252(A/G) lymphotoxin-alpha and the -308(A/G) tumor necrosis factor-alpha genes and susceptibility to chronic periodontitis in a Czech population. J Periodontal Res. 2003 Aug;38(4):394-9.
- FERNANDES JC, MARTEL-PELLETIER J, PELLETIER JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. Biorheology. 2002;39(1-2):237-46.
- FERRANTE A. Activation of neutrophils by interleukins-1 and -2 and tumor necrosis factors. Immunol Ser 1992;57:417-436.
- FINNEGAN A, GRUSBY MJ, KAPLAN CD, O'NEILL SK, EIBEL H, KORENY T, CZIPRI M, MIKECZ K, ZHANG J. IL-4 and IL-12 regulate proteoglycan-induced arthritis through Stat-dependent mechanisms. J Immunol. 2002 Sep 15;169(6):3345-52.
- FIORENTINO DF, ZLOTNIK A, MOSMANN TR, HOWARD M, O'GARRA A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J Immunol.;147(11):3815-22,1991.
- FIVES-TAYLOR P., MEYER D., MINTZ K. BRISSETTE C. Virulence factors of Actinobacillus actinomycetemcomitans. Periodontol 2000, 20:136-167, 1999.
- FIVES-TAYLOR P, MEYER D, MINTZ K. Characteristics of Actinobacillus actinomycetemcomitans invasion of and adhesion to cultured epithelial cells. Adv Dent Res. 1995 Feb;9(1):55-62.
- FOKKEMA SJ, LOOS BG, DE SLEGTE C, BURGER W, PISCAER M, IJZERMAN Y, VAN DER VELDEN U. Increased release of IL-12p70 by monocytes after periodontal therapy. J Clin Periodontol. 2003 Dec;30(12):1091-6.

- FOWLER EB, BREAULT LG, CUENIN MF. Periodontal disease and its association with systemic disease. Mil Med.;166(1):85-9, 2001.
- FREVERT CW, FARONE A, DANAEE H, PAULAUSKIS JD, KOBZIK L. Functional characterization of rat chemokine macrophage inflammatory protein-2. Inflammation. 1995 Feb;19(1):133-42.
- FREVERT CW, HUANG S, DANAEE H, PAULAUSKIS JD, KOBZIK L. Functional characterization of the rat chemokine KC and its importance in neutrophil recruitment in a rat model of pulmonary inflammation. J Immunol. 1995 Jan 1;154(1):335-44.
- FUJIHASHI K, KONO Y, BEAGLEY KW, YAMAMOTO M, MCGHEE JR, MESTECKY J, KIYONO H. Cytokines and peridontal disease: immunopathological role of interleukins for B cell responses in chronic inflamed gingival tissues. J Peridontol.;64(5S):400-406, 1993.
- FUJIHASHI K, YAMAMOTO M, HIROI T, BAMBERG TV, MCGHEE JR, KIYONO H. Selected Th1 and Th2 cytokine mRNA expression by CD4(+) T cells isolated from inflamed human gingival tissues. Clin Exp Immunol.;103(3):422-8, 1996
- GABAY C, KUSHNER I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. N Engl J Med. 1999 Feb 11;340(6):448-54.
- GAMONAL J, ACEVEDO A, BASCONES A, JORGE O, SILVA A. Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. J Periodontal Res.;36(3):194-203,2001.
- GAMONAL J, BASCONES A, JORGE O, SILVA A. Chemokine RANTES in gingival crevicular fluid of adult patients with periodontitis. J Clin Periodontol.;27(9):675-681,2000.
- GARLET GP, AVILA-CAMPOS MJ, SILVA JS. Actinobacyllus actinomycetencomitans-induced periodontal disease in mice: pattern of cytokines, chemokines, chemokine receptors expression and leukocyte migration. Microbes and Infection, *In press*.
- GARLET GP, MARTINS JR W, FERREIRA BR, MILANEZI CM, SILVA JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. J Periodontal Res. 2003 Apr;38(2):210-7.
- GARLET GP, MARTINS W JR, FONSECA BA, FERREIRA BR, SILVA JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. J Clin Periodontol. 2004 Aug;31(8):671-9.
- GEMMELL E, CARTER CL, SEYMOUR GJ. Chemokines in human periodontal disease tissues. Clin Exp Immunol. 2001 Jul;125(1):134-41.
- GEMMELL E, MARSHALL RI, SEYMOUR GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. Periodontol 2000. 1997 Jun;14:112-43.
- GEMMELL E, SEYMOUR GJ. Cytokine profiles of cells extracted from humans with periodontal diseases. J Dent Res.;77(1):16-26, 1998.
- GEMMELL E, SEYMOUR GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. Periodontol 2000. 2004;35:21-41.
- GENCO CA, VANDYKE T, AMAR S. Animal models for Porphyromononas gingivalis-mediated periodontal disease. Trends Microbiol.;6(11):444-9,1998.

GENCO RJ. Host responses in periodontal diseases: current concepts. J Periodontol. 63(4):338-355, 1992.

GERARD C, ROLLINS BJ. Chemokines and disease. Nature Immunol.;2(2):108-115,2001.

- GERSTENFELD LC, CHO TJ, KON T, AIZAWA T, TSAY A, FITCH J, BARNES GL, GRAVES DT, EINHORN TA. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. J Bone Miner Res. 2003 Sep;18(9):1584-92.
- GIANNOPOULOU C, KAMMA JJ, MOMBELLI A. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. J Clin Periodontol. 2003 Feb;30(2):145-53.
- GIBSON FC 3RD, GENCO CA. Prevention of Porphyromonas gingivalis-induced oral bone loss following immunization with gingipain R1. Infect Immun. 2001 Dec;69(12):7959-63.
- GOLDRING MB. Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. Curr Rheumatol Rep. 2000 Dec;2(6):459-65.
- GOLUB LM, MCNAMARA TF, RYAN ME, KOHUT B, BLIEDEN T, PAYONK G, SIPOS T, BARON HJ. Adjunctive treatment with subantimicrobial doses of doxycycline: effects on gingival fluid collagenase activity and attachment loss in adult periodontitis. J Clin Periodontol. 2001 Feb;28(2):146-56.
- GORSKA R, GREGOREK H, KOWALSKI J, LASKUS-PERENDYK A, SYCZEWSKA M, MADALINSKI K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. J Clin Periodontol. 2003 Dec;30(12):1046-52.
- GOUTOUDI P, DIZA E, ARVANITIDOU M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1beta and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. J Dent. 2004 Sep;32(7):511-20.
- GRACIE JA, FORSEY RJ, CHAN WL, GILMOUR A, LEUNG BP, GREER MR, KENNEDY K, CARTER R, WEI XQ, XU D, FIELD M, FOULIS A, LIEW FY, MCINNES IB. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. J Clin Invest. 1999 Nov;104(10):1393-401.

GRACIE JA, ROBERTSON SE, MCINNES IB. Interleukin-18. J Leukoc Biol. 2003 Feb;73(2):213-24.

- GRAVES DT, CHEN CP, DOUVILLE C, JIANG Y. Interleukin-1 receptor signaling rather than that of tumor necrosis factor is critical in protecting the host from the severe consequences of a polymicrobe anaerobic infection. Infect Immun. 2000 Aug;68(8):4746-51.
- GRAVES DT, DELIMA AJ, ASSUMA R, AMAR S, OATES T, COCHRAN D. Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis. J Periodontol. 1998 Dec;69(12):1419-25.
- GRAVES DT, OSKOUI M, VOLEJNIKOVA S, NAGUIB G, CAI S, DESTA T, KAKOURAS A, JIANG Y. Tumor necrosis factor modulates fibroblast apoptosis, PMN recruitment, and osteoclast formation in response to P. gingivalis infection. J Dent Res. 2001 Oct;80(10):1875-9.
- GRAVES DT, COCHRAN D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. J Periodontol. 2003 Mar;74(3):391-401.
- GRAVES DT, JIANG Y. Chemokines, a family of chemotactic cytokines. Crit Rev Oral Biol Med. 1995;6(2):109-18.
- GRAYSON R, DOUGLAS CW, Heath J, Rawlinson A, Evans GS. Activation of human matrix metalloproteinase 2 by gingival crevicular fluid and Porphyromonas gingivalis. J Clin Periodontol. 2003 Jun;30(6):542-50.
- GYURKO R, BOUSTANY G, HUANG PL, KANTARCI A, VAN DYKE TE, GENCO CA, GIBSON FC 3RD. Mice lacking inducible nitric oxide synthase demonstrate impaired killing of Porphyromonas gingivalis. Infect Immun. 2003 Sep;71(9):4917-24.
- HAERIAN A, ADONOGIANAKI E, MOONEY J, DOCHERTY JP, KINANE DF. Gingival crevicular stromelysin, collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases levels in healthy and diseased sites. J Clin Periodontol. 1995 Jul;22(7):505-9.

- HAFFAJEE AD, SOCRANSKY SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000;5:78-111, 1994.
- HAMILTON TA, OHMORI Y, TEBO J. Regulation of chemokine expression by antiinflammatory cytokines. Immunol Res. 2002;25(3):229-45
- HAMILTON TA, OHMORI Y, TEBO JM, KISHORE R. Regulation of macrophage gene expression by proand anti-inflammatory cytokines. Pathobiology. 1999;67(5-6):241-4.
- HAN YW, REDLINE RW, LI M, YIN L, HILL GB, MCCORMICK TS. Fusobacterium nucleatum induces premature and term stillbirths in pregnant mice: implication of oral bacteria in preterm birth. Infect Immun. 2004 Apr;72(4):2272-9.
- HARRIS SG, PADILLA J, KOUMAS L, RAY D, PHIPPS RP. Prostaglandins as modulators of immunity. Trends Immunol. 2002 Mar; 23(3): 144-50.
- HAUBEK D, ENNIBI OK, POULSEN K, BENZARTI N, BAELUM V. The Highly Leukotoxic JP2 Clone of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Progression of Periodontal Attachment Loss. J Dent Res. 2004 Oct;83(10):767-70.
- HEGEMANN N, WONDIMU A, ULLRICH K, SCHMIDT MF. Synovial MMP-3 and TIMP-1 levels and their correlation with cytokine expression in canine rheumatoid arthritis. Vet Immunol Immunopathol. 2003 Feb 10;91(3-4):199-204.
- HENDERSON B, NAIR SP. Hard labour: bacterial infection of the skeleton. Trends Microbiol. 2003 Dec;11(12):570-7.
- HENDERSON B, WILSON M, SHARP L, WARD JM. Actinobacillus actinomycetemcomitans. J Med Microbiol. 2002 Dec;51(12):1013-20.
- HERSHEY GK. IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. J Allergy Clin Immunol. 2003 Apr;111(4):677-90;
- HIROSE M, ISHIHARA K, SAITO A, NAKAGAWA T, YAMADA S, OKUDA K. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. J Periodontol.;72(5):590-597,2001.
- HOLSCHER C. The power of combinatorial immunology: IL-12 and IL-12-related dimeric cytokines in infectious diseases. Med Microbiol Immunol (Berl). 2004 Feb;193(1):1-17.
- HOURI-HADDAD Y, SOSKOLNE WA, SHAI E, PALMON A, SHAPIRA L. Interferon-gamma deficiency attenuates local P. gingivalis-induced inflammation. J Dent Res. 2002 Jun; 81(6): 395-8.
- HSU DH, MOORE KW, SPITS H. Differential effects of IL-4 and IL-10 on IL-2-induced IFN-gamma synthesis and lymphokine-activated killer activity. Int Immunol. 1992 May;4(5):563-9.
- HULTGREN OH, STENSON M, TARKOWSKI A. Role of IL-12 in Staphylococcus aureus-triggered arthritis and sepsis. Arthritis Res. 2001;3(1):41-7.
- IDE M, JAGDEV D, COWARD PY, CROOK M, BARCLAY GR, WILSON RF. The short-term effects of treatment of chronic periodontitis on circulating levels of endotoxin, C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6. J Periodontol. 2004 Mar;75(3):420-8.
- IELLEM A, MARIANI M, LANG R, RECALDE H, PANINA-BORDIGNON P, SINIGAGLIA F, D'AMBROSIO D. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. J Exp Med. 2001 Sep 17; 194(6): 847-53.
- INGMAN T, TERVAHARTIALA T, DING Y, TSCHESCHE H, HAERIAN A, KINANE DF, KONTTINEN YT, SORSA T. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. J Clin Periodontol. 1996 Dec;23(12):1127-32.
- RAMAMURTHY NS, XU JW, BIRD J, BAXTER A, BHOGAL R, WILLS R, WATSON B, OWEN D, WOLFF M, GREENWALD RA. Inhibition of alveolar bone loss by matrix metalloproteinase inhibitors in experimental periodontal disease. J Periodontal Res. 2002 Feb;37(1):1-7.
- IREDALE JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. Int J Biochem Cell Biol. 1997 Jan;29(1):43-54.
- ISHIHARA K, NABUCHI A, ITO R, MIYACHI K, KURAMITSU HK, OKUDA K. Correlation between detection rates of periodontopathic bacterial DNA in carotid coronary stenotic artery plaque and in dental plaque samples. J Clin Microbiol. 2004 Mar;42(3):1313-5.
- IWASAKI Y, HARA Y, KOJI T, SHIBATA Y, NAKANE PK, KATO I. Differential expression of IFN-gamma, IL-4, IL-10, and IL-1beta mRNAs in decalcified tissue sections of mouse lipopolysaccharide-induced periodontitis mandibles assessed by in situ hybridization. Histochem Cell Biol.;109(4):339-47, 1998.
- IZUHARA K, ARIMA K, YASUNAGA S. IL-4 and IL-13: their pathological roles in allergic diseases and their potential in developing new therapies. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2002 Sep;1(3):263-9.
- JANKOVIC D, LIU Z, GAUSE WC. Th1 and Th2-cell commitment during infectious disease: asymetry in divergent pathways. Trends Immunol.;22(8):450-457,2001.
- JARNICKI AG, FALLON PG. T helper type-2 cytokine responses: potential therapeutic targets. Curr Opin Pharmacol. 2003 Aug;3(4):449-55.
- JIANG Y, MAGLI L, RUSSO M. Bacterium-dependent induction of cytokines in mononuclear cells and their pathologic consequences in vivo. Infect Immun. 1999 May;67(5):2125-30.
- JOOSTEN LA, HEUVELMANS-JACOBS M, LUBBERTS E, VAN DE LOO FA, BAKKER AC, HELSEN MM, RICHARDS CD, VAN DEN BERG WB. Local interleukin-12 gene transfer promotes conversion of an acute arthritis to a chronic destructive arthritis. Arthritis Rheum. 2002 May;46(5):1379-89.
- JOTWANI R, CUTLER CW. 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. 2004 Mar;72(3):1725-32.
- JOTWANI R, PALUCKA AK, AL-QUOTUB M, NOURI-SHIRAZI M, KIM J, BELL D, BANCHEREAU J, CUTLER CW. Mature dendritic cells infiltrate the T cell-rich region of oral mucosa in chronic periodontitis: in situ, in vivo, and in vitro studies. J Immunol. 2001 Oct 15;167(8):4693-700.
- KABASHIMA H, NAGATA K, HASHIGUCHI I, TORIYA Y, IIJIMA T, MAKI K, MAEDA K. Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-4 in gingival crevicular fluid of patients with inflammatory periodontal disease. J Oral Pathol Med. 1996 Sep;25(8):449-55.
- KAGEYAMA Y, KOIDE Y, YOSHIDA A, UCHIJIMA M, ARAI T, MIYAMOTO S, OZEKI T, HIYOSHI M, KUSHIDA K, INOUE T. Reduced susceptibility to collagen-induced arthritis in mice deficient in IFNgamma receptor. J Immunol. 1998 Aug 1; 161(3): 1542-8
- KATAGIRI T, TAKAHASHI N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. Oral Dis. 2002 May;8(3):147-59. Review.
- Katrib A, Smith MD, Ahern MJ, Slavotinek J, Stafford L, Cuello C, Bertouch JV, McNeil HP, Youssef PP. Reduced chemokine and matrix metalloproteinase expression in patients with rheumatoid arthritis achieving remission. J Rheumatol. 2003 Jan;30(1):10-21.
- KAWAI T, EISEN-LEV R, SEKI M, EASTCOTT JW, WILSON ME, TAUBMAN MA. Requirement of B7 costimulation for Th1-mediated inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. J Immunol. 2000 Feb 15;164(4):2102-9.
- KAWASHIMA N, STASHENKO P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. Arch Oral Biol. 1999 Jan;44(1):55-66.

- KENDALL HK, HAASE HR, LI H, XIAO Y, BARTOLD PM. Nitric oxide synthase type-II is synthesized by human gingival tissue and cultured human gingival fibroblasts. J Periodontal Res. 2000 Aug;35(4):194-200.
- KENDALL HK, MARSHALL RI, BARTOLD PM. Nitric oxide and tissue destruction. Oral Dis. 2001 Jan;7(1):2-10.
- KIILI M, COX SW, CHEN HY, WAHLGREN J, MAISI P, ELEY BM, SALO T, SORSA T, CHEN HW. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. J Clin Periodontol. 2002 Mar;29(3):224-32.
- KIKUCHI T, HAHN CL, TANAKA S, BARBOUR SE, SCHENKEIN HA, TEW JG. Dendritic cells stimulated with Actinobacillus actinomycetemcomitans elicit rapid gamma interferon responses by natural killer cells. Infect Immun. 2004 Sep;72(9):5089-96.
- KIKUCHI T, HAHN CL, TANAKA S, BARBOUR SE, SCHENKEIN HA, TEW JG. Dendritic cells stimulated with Actinobacillus actinomycetemcomitans elicit rapid gamma interferon responses by natural killer cells. Infect Immun. 2004 Sep;72(9):5089-96.
- KIM W, MIN S, CHO M, YOUN J, MIN J, LEE S, PARK S, CHO C, KIM H, KIM WU, MIN SY, CHO ML, MIN DJ, LEE SH, PARK SH, CHO CS, KIM HY. The role of IL-12 in inflammatory activity of patients with rheumatoid arthritis (RA). Clin Exp Immunol. 2000 Jan;119(1):175-81.
- KINANE DF, DARBY IB, SAID S, LUOTO H, SORSA T, TIKANOJA S, MANTYLA P. Changes in gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels during periodontal treatment and maintenance. J Periodontal Res. 2003 Aug;38(4):400-4.
- KINANE DF, LAPPIN DF. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. Acta Odontol Scand. 2001 Jun;59(3):154-60.
- KITAURA H, NAGATA N, FUJIMURA Y, HOTOKEZAKA H, TATAMIYA M, NAKAO N, YOSHIDA N, NAKAYAMA K. Interleukin-4 directly inhibits tumor necrosis factor-alpha-mediated osteoclast formation in mouse bone marrow macrophages. Immunol Lett. 2003 Sep 8;88(3):193-8.
- KOBAYASHI H, NAGASAWA T, ARAMAKI M, MAHANONDA R, ISHIKAWA I. Individual diversities in interferon gamma production by human peripheral blood mononuclear cells stimulated with periodontopathic bacteria. J Periodontal Res. 2000 Dec;35(6):319-28.
- KOBAYASHI H, NAGASAWA T, ARAMAKI M, MAHANONDA R, ISHIKAWA I. Individual diversities in interferon gamma production by human peripheral blood mononuclear cells stimulated with periodontopathic bacteria. J Periodontal Res.; 35(6):319-328, 2000.
- KOJ A. Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. Biochim Biophys Acta. 1996 Nov 15;1317(2):84-94.
- KONDO S, SAUDER DN. Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 1 (p55) is a main mediator for TNFalpha-induced skin inflammation. Eur J Immunol. 1997 Jul;27(7):1713-8.
- KONG YY, FEIGE U, SAROSI I, BOLON B, TAFURI A, MORONY S, CAPPARELLI C, LI J, ELLIOTT R, MCCABE S, WONG T, CAMPAGNUOLO G, MORAN E, BOGOCH ER, VAN G, NGUYEN LT, OHASHI PS, LACEY DL, FISH E, BOYLE WJ, PENNINGER JM. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. Nature. 1999 Nov 18;402(6759):304-9.
- KORDES U, BEUTEL K, CACHOVAN G, SCHAFER H, HELMKE K, SOBOTTKA I. Gingivitis as probable source of a thoracic actinomycosis due to Actinomyces israelii and Actinobacillus actinomycetemcomitans. Arch Dis Child. 2004 Oct;89(10):895.

- KUBOTA T, NOMURA T, TAKAHASHI T, HARA K. Expression of mRNA for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontitis-affected human gingival tissue. Arch Oral Biol. 1996 Mar;41(3):253-62.
- KURITA-OCHIAI T, OCHIAI K. Immunosupressive factor from Actinobacillus actinomycetemcomitans down regulates cytokine production. Infect Immun.;64(1):50-54,1996.
- KUT-LASSERRE C, MILLER CC, EJEIL AL, GOGLY B, DRIDI M, PICCARDI N, GUILLOU B, PELLAT B, GODEAU G. Effect of avocado and soybean unsaponifiables on gelatinase A (MMP-2), stromelysin 1 (MMP-3), and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (TIMP- 1 and TIMP-2) secretion by human fibroblasts in culture. J Periodontol. 2001 Dec;72(12):1685-94.
- KWAN TAT S, PADRINES M, THEOLEYRE S, HEYMANN D, FORTUN Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. Cytokine Growth Factor Rev. 2004 Feb;15(1):49-60.
- LABOW M, SHUSTER D, ZETTERSTROM M, NUNES P, TERRY R, CULLINAN EB. Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. J Immunol 1997; 159: 2452-2461.
- LALLA E, LAMSTER IB, HOFMANN MA, BUCCIARELLI L, JERUD AP, TUCKER S, LU Y, PAPAPANOU PN, SCHMIDT AM. Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003 Aug 1;23(8):1405-11.
- LANCHOU J, CORBEL M, TANGUY M, GERMAIN N, BOICHOT E, THERET N, CLEMENT B, LAGENTE V, MALLEDANT Y. Imbalance between matrix metalloproteinases (MMP-9 and MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in acute respiratory distress syndrome patients. Crit Care Med. 2003 Feb;31(2):536-42.
- LAPPIN DF, KJELDSEN M, SANDER L, KINANE DF. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. J Periodontal Res.;35(6):369-73,2000.
- LAPPIN DF, MACLEOD CP, KERR A, MITCHELL T, KINANE DF. Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. Clin Exp Immunol.;123(2):294-300,2001.
- LAUWERYS BR, VAN SNICK J, HOUSSIAU FA. Serum IL-12 in systemic lupus erythematosus: absence of p70 heterodimers but presence of p40 monomers correlating with disease activity. Lupus. 2002;11(6):384-7.
- LE PAGE C, GENIN P, BAINES MG, HISCOTT J. Interferon activation and innate immunity. Rev Immunogenet. 2000; 2(3): 374-86.
- LEENEN PJ, CANONO BP, DREVETS DA, VOERMAN JS, CAMPBELL PA: TNF-alpha and IFN-gamma stimulate a macrophage precursor cell line to kill Listeria monocytogenes in a nitric oxide-independent manner. J Immunol 1994, 153:5141-5147
- LEON LR, KOZAK W, PESCHON J, KLUGER MJ. Exacerbated febrile responses to LPS, but not turpentine, in TNF double receptor-knockout mice. Am J Physiol 1997; 272: R563-569.
- LI X, KOLLTVEIT KM, TRONSTAD L, OLSEN I. Systemic diseases caused by oral infection. Clin Microbiol Rev.;13(4):547-58,2000.
- LI YY, MCTIERNAN CF, FELDMAN AM. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. Cardiovasc Res. 2000 May;46(2):214-24.
- LIEW FY. The role of innate cytokines in inflammatory response. Immunol Lett. 2003 Jan 22; 85(2): 131-4.
- LISKMANN S, ZILMER M, VIHALEMM T, SALUM O, FISCHER K. Correlation of peri-implant health and myeloperoxidase levels: a cross-sectional clinical study. Clin Oral Implants Res. 2004 Oct;15(5):546-52.

- LIU D, XU JK, FIGLIOMENI L, HUANG L, PAVLOS NJ, ROGERS M, TAN A, PRICE P, ZHENG MH. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. Int J Mol Med. 2003 Jan;11(1):17-21.
- LIU D, XU JK, FIGLIOMENI L, HUANG L, PAVLOS NJ, ROGERS M, TAN A, PRICE P, ZHENG MH. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. Int J Mol Med. 2003 Jan;11(1):17-21.
- LOESCHE W.J. Bacterial mediators in periodontal disease. Clin Infect Dis.;16 Suppl 4:S203-10, 1993.
- LOHINAI Z, BENEDEK P, FEHER E, GYORFI A, ROSIVALL L, FAZEKAS A, SALZMAN AL, SZABO C. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. Br J Pharmacol. 1998 Feb;123(3):353-60.
- LUTHER SA, CYSTER JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. Nature Immunol 2001;2:102-107.
- MAHMOUD FA, RIVERA NI. The role of C-reactive protein as a prognostic indicator in advanced cancer. Curr Oncol Rep. 2002 May;4(3):250-5.
- MAJKA S, MCGUIRE PG, DAS A. Regulation of matrix metalloproteinase expression by tumor necrosis factor in a murine model of retinal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002 Jan;43(1):260-6.
- MANTOVANI A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. Immunol Today; 20:254-257,1999.
- MARTELLI-JUNIOR H, COTRIM P, GRANER E, SAUK JJ, COLETTA RD. Effect of transforming growth factor-beta1, interleukin-6, and interferon-gamma on the expression of type I collagen, heat shock protein 47, matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-2 by fibroblasts from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis. J Periodontol. 2003 Mar;74(3):296-306.
- MARTIN BF, DERBY BM, BUDZILOVICH GN, RANSOHOFF J. Brain abscess due to Actinobacillus actinomycetemcomitans. Neurology. 1967 Sep;17(9):833-7.
- MARTINELLI S, UROSEVIC M, DARYADEL A, OBERHOLZER PA, BAUMANN C, FEY MF, DUMMER R, SIMON HU, YOUSEFI S. Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation. J Biol Chem. 2004 Oct 15;279(42):44123-32.
- MATEJKA M, PARTYKA L, ULM C, SOLAR P, SINZINGER H. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. J Periodontal Res. 1998 Nov;33(8):517-8.
- MATHUR A, YANG C, WOLFF L. Cytokines in gingival crevicular fluid of periodontally diseased and healthy sites. J Periodontal Res, 1996;31:489-495.
- MATSUKI Y, YAMAMOTO T, HARA K. Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)expressing cells in human inflamed gingiva by combined in sity hybridization and immunohistochemistry. Immunology;76(1):42-47,1992.
- MATTILA K, VESANEN M, VALTONEN V, NIEMINEN M, PALOSUO T, RASI V, ASIKAINEN S. Effect of treating periodontitis on C-reactive protein levels: a pilot study. BMC Infect Dis. 2002 Dec 10;2(1):30.
- MAURI C, FELDMANN M, WILLIAMS RO. Down-regulation of Th1-mediated pathology in experimental arthritis by stimulation of the Th2 arm of the immune response. Arthritis Rheum. 2003 Mar; 48(3): 839-45.
- MCGUIRK P, MILLS KH. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. Trends Immunol. 2002 Sep;23(9):450-5.
- MCLOUGHLIN RM, WITOWSKI J, ROBSON RL, WILKINSON TS, HURST SM, WILLIAMS AS, WILLIAMS JD, ROSE-JOHN S, JONES SA, TOPLEY N. Interplay between IFN-gamma and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation. J Clin Invest. 2003 Aug; 112(4): 598-607.

- MERCADO FB, MARSHALL RI, BARTOLD PM. Inter-relationships between rheumatoid arthritis and periodontal disease. A review. J Clin Periodontol. 2003 Sep; 30(9): 761-72.
- MERCADO FB, MARSHALL RI, KLESTOV AC, BARTOLD PM. Relationship between rheumatoid arthritis and periodontitis. J Periodontol. 2001 Jun;72(6):779-87.
- MERKEL KD, ERDMANN JM, MCHUGH KP, ABU-AMER Y, ROSS FP, TEITELBAUM SL. Tumor necrosis factor-alpha mediates orthopedic implant osteolysis. Am J Pathol. 1999 Jan;154(1):203-10.
- MERTZ PM, DEWITT DL, STETLER-STEVENSON WG, WAHL LM. Interleukin 10 suppression of monocyte prostaglandin H synthase-2. Mechanism of inhibition of prostaglandin-dependent matrix metalloproteinase production. J Biol Chem. 1994 Aug 19;269(33):21322-9.
- MIRANDA LA, FISCHER RG, SZTAJNBOK FR, FIGUEREDO CM, GUSTAFSSON A. Periodontal conditions in patients with juvenile idiopathic arthritis. J Clin Periodontol. 2003 Nov;30(11):969-74.
- MITTRUCKER HW, KAUFMANN SH. Regulatory T cells and infection: suppression revisited. Eur J Immunol. 2004 Feb;34(2):306-12.
- MIYASAKI KT, BODEAU AL, FLEMMIG TF. Differential killing of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Capnocytophaga spp. by human neutrophil granule components. Infect Immun. 1991 Oct;59(10):3760-7.
- MIYASAKI KT, NEMIROVSKIY E. Myeloperoxidase isoform activities released by human neutrophils in response to dental and periodontal bacteria. Oral Microbiol Immunol. 1997 Feb;12(1):27-32.
- MIYASAKI KT, WILSON ME, GENCO RJ. Killing of Actinobacillus actinomycetemcomitans by the human neutrophil myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system. Infect Immun. 1986 Jul;53(1):161-5.
- MIYASAKI KT. The neutrophil: mechanisms of controlling periodontal bacteria. J Periodontol. 1991 Dec;62(12):761-74.
- MIZGERD JP, SPIEKER MR, DOERSCHUK CM. Early response cytokines and innate immunity: essential roles for TNF receptor 1 and type I IL-1 receptor during Escherichia coli pneumonia in mice. J Immunol. 2001 Mar 15;166(6):4042-8.
- MOCHIZUKI S, KOBAYASHI M, SUZUKI T, OIKAWA A, KOSEKI T, NISHIHARA T, HASEGAWA K. Gamma-interferon enhances expression of CD14/MyD88 and subsequent responsiveness to lipopolysaccharide from Actinobacillus actinomycetemcomitans in human gingival fibroblasts. J Periodontal Res. 2004 Oct;39(5):333-43.
- MOGI M, OTOGOTO J, OTA N, TOGARI A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. J Dent Res. 2004 Feb;83(2):166-9.
- MOHAMMED FF, SMOOKLER DS, KHOKHA R. Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2003 Nov; 62 Suppl 2: ii43-7.
- MOORE KW, O'GARRA A, DE WAAL MALEFYT R, VIEIRA P, MOSMANN TR. Interleukin-10. Annu Rev Immunol. 1993;11:165-90.
- MORENO JL, KACZMAREK M, KEEGAN AD, TONDRAVI M. IL-4 suppresses osteoclast development and mature osteoclast function by a STAT6-dependent mechanism: irreversible inhibition of the differentiation program activated by RANKL. Blood. 2003 Aug 1;102(3):1078-86.
- MORIYAMA H, UKAI T, HARA Y. Interferon-gamma production changes in parallel with bacterial lipopolysaccharide induced bone resorption in mice: an immunohistometrical study. Calcif Tissue Int. 2002 Jul;71(1):53-8.

- MORRIS JF, SEWELL DL. Necrotizing pneumonia caused by mixed infection with Actinobacillus actinomycetemcomitans and Actinomyces israelii: case report and review. Clin Infect Dis. 1994 Mar;18(3):450-2.
- MORRISON CJ, BRUMMER E, ISENBERG RA, STEVENS DA. Activation of murine polymorphonuclear neutrophils for fungicidal activity by recombinant gamma interferon. J Leukoc Biol. 1987 May;41(5):434-40.
- MOSMANN TR, COFFMAN RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol.;7:145-173,1989.
- MUHLE I, RAU J, RUSKIN J. Vertebral osteomyelitis due to Actinobacillus actinomycetemcomitans. JAMA. 1979 Apr 27;241(17):1824-5.
- MURPHY KM, REINER SL. The lineage decisions of helper T cells. Nat Rev Immunol. 2002 Dec;2(12):933-44.
- MURPHY G, DOCHERTY AJ, HEMBRY RM, REYNOLDS JJ. Metalloproteinases and tissue damage. Br J Rheumatol. 1991;30 Suppl 1:25-31.
- NAKANISHI K, YOSHIMOTO T, TSUTSUI H, OKAMURA H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. Cytokine Growth Factor Rev. 2001 Mar;12(1):53-72.
- NAWROCKI B, POLETTE M, MARCHAND V, MONTEAU M, GILLERY P, TOURNIER JM, BIREMBAUT P. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human bronchopulmonary carcinomas: quantificative and morphological analyses. Int J Cancer. 1997 Aug 7;72(4):556-64.
- NELMS K, KEEGAN AD, ZAMORANO J, RYAN JJ, PAUL WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. Annu Rev Immunol. 1999;17:701-38.
- NEUMANN B, EMMANUILIDIS K, STADLER M, HOLZMANN B. Distinct functions of interferon-gamma for chemokine expression in models of acute lung inflammation. Immunology. 1998 Dec;95(4):512-21.
- NOACK B, GENCO RJ, TREVISAN M, GROSSI S, ZAMBON JJ, DE NARDIN E. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. J Periodontol. 2001 Sep;72(9):1221-7.
- NOMURA T, ISHII A, OISHI Y, KOHMA H, HARA K. Tissue inhibitors of metalloproteinases level and collagenase activity in gingival crevicular fluid: the relevance to periodontal diseases. Oral Dis. 1998 Dec;4(4):231-40.
- NOVELLI F, CASANOVA JL. The role of IL-12, IL-23 and IFN-gamma in immunity to viruses. Cytokine Growth Factor Rev. 2004 Oct;15(5):367-77.
- OATES TW, GRAVES DT, COCHRAN DL. Clinical, radiographic and biochemical assessment of IL-1/TNFalpha antagonist inhibition of bone loss in experimental periodontitis.J Clin Periodontol. 2002 Feb; 29(2): 137-43.
- OBONYO M, GUINEY DG, HARWOOD J, FIERER J, COLE SP. Role of gamma interferon in Helicobacter pylori induction of inflammatory mediators during murine infection. Infect Immun. 2002 Jun;70(6):3295-9.
- OFFENBACHER S, ODLE BM, BRASWELL LD, JOHNSON HG, HALL CM, MCCLURE H, ORKIN JL, STROBERT EA, GREEN MD. Changes in cyclooxygenase metabolites in experimental periodontitis in Macaca mulatta. J Periodontal Res. 1989 Jan;24(1):63-74.
- O'GARRA A. Interleukins and the immune system 1. Lancet. 1989 Apr 29; 1(8644): 943-7.
- ORINGER RJ; Research, Science, and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. Modulation of the host response in periodontal therapy.J Periodontol. 2002 Apr; 73(4): 460-70.

- OVERHOLT BF. Actinobacillus actinomycetemcomitans endocarditis. Arch Intern Med. 1966 Jan;117(1):99-102.
- OWENS JM, GALLAGHER AC, CHAMBERS TJ. IL-10 modulates formation of osteoclasts in murine hemopoietic cultures. J Immunol. 1996 Jul 15;157(2):936-40.
- PAGE RC. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. Ann Periodontol. 1998 Jul;3(1):108-20.
- PARSONS CJ, BRADFORD BU, PAN CQ, CHEUNG E, SCHAUER M, KNORR A, KREBS B, KRAFT S, ZAHN S, BROCKS B, FEIRT N, MEI B, CHO MS, RAMAMOORTHI R, ROLDAN G, NG P, LUM P, HIRTH-DIETRICH C, TOMKINSON A, BRENNER DA. Antifibrotic effects of a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 antibody on established liver fibrosis in rats. Hepatology. 2004 Nov;40(5):1106-15.
- PATUREL L, CASALTA JP, HABIB G, NEZRI M, RAOULT D. Actinobacillus actinomycetemcomitans endocarditis. Clin Microbiol Infect. 2004 Feb;10(2):98-118.
- PEEVA E, FISHMAN AD, GODDARD G, WADLER S, BARLAND P. Rheumatoid arthritis exacerbation caused by exogenous interleukin-12. Arthritis Rheum. 2000 Feb;43(2):461-3.
- PENDER SL, FELL JM, CHAMOW SM, ASHKENAZI A, MACDONALD TT. A p55 TNF receptor immunoadhesin prevents T cell-mediated intestinal injury by inhibiting matrix metalloproteinase production. J Immunol. 1998 Apr 15;160(8):4098-103.
- PERSSON GR, ENGEL LD, WHITNEY CW, WEINBERG A, MONCLA BJ, DARVEAU RP, HOUSTON L, BRAHAM P, PAGE RC. Macaca fascicularis as a model in which to assess the safety and efficacy of a vaccine for periodontitis. Oral Microbiol Immunol. 1994 Apr;9(2):104-11.
- PESCHON JJ, TORRANCE DS, STOCKING KL, GLACCUM MB, OTTEN C, WILLIS CR, CHARRIER K, MORRISSEY PJ, WARE CB, MOHLER KM. TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. J Immunol. 1998 Jan 15;160(2):943-52.
- PESTKA S, KRAUSE CD, SARKAR D, WALTER MR, SHI Y, FISHER PB. Interleukin-10 and Related Cytokines and Receptors. Annu Rev Immunol. 2004 Apr;22:929-979.
- PETIT MD, HOVENKAMP E, HAMANN D, ROOS MT, VAN DER VELDEN U, MIEDEMA F, LOOS BG. Phenotypical and functional analysis of T cells in periodontitis. J Periodontal Res. 2001 Aug;36(4):214-20.
- PETIT MD, HOVENKAMP E, HAMANN D, ROOS MT, VAN DER VELDEN U, MIEDEMA F, LOOS BG. Phenotypical and functional analysis of T cells in periodontitis. J Periodontal Res.; 36(4):241-220, 2001.
- PFEFFER K, MATSUYAMA T, KUNDIG TM, WAKEHAM A, KISHIHARA K, SHAHINIAN A, WIEGMANN K, OHASHI PS, KRONKE M, MAK TW. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. Cell. 1993 May 7;73(3):457-67.
- PFIZENMAIER K, WAJANT H, GRELL M. Tumor necrosis factors in 1996. Cytokine Growth Factor Rev. 1996 Oct;7(3):271-7.
- PUREN AJ, FANTUZZI G, GU Y, SU MSS, DINARELLO CA. Interleukin-18 (IFNgamma-inducing factor) induces IL-8 and IL-1ß via TNFalpha production from non-CD14(+) human blood mononuclear cells. J Clin Invest1998;101:711–21 (8)
- RAMADORI G, CHRIST B. Cytokines and the hepatic acute-phase response. Semin Liver Dis. 1999;19(2):141-55.
- RAMAMURTHY NS, XU JW, BIRD J, BAXTER A, BHOGAL R, WILLS R, WATSON B, OWEN D, WOLFF M, GREENWALD RA. Inhibition of alveolar bone loss by matrix metalloproteinase inhibitors in experimental periodontal disease. J Periodontal Res. 2002 Feb;37(1):1-7.

- RAUSCH-FAN X, MATEJKA M. From plaque formation to periodontal disease, is there a role for nitric oxide? Eur J Clin Invest. 2001 Oct;31(10):833-5.
- REDDY MS, GEURS NC, GUNSOLLEY JC. Periodontal host modulation with antiproteinase, antiinflammatory, and bone-sparing agents. A systematic review. Ann Periodontol. 2003 Dec;8(1):12-37.
- REKDAL O, OSTERUD B, SVENDSEN JS, WINBERG JO. Evidence for exclusive role of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor in mediating the TNF-induced collagenase expression by human dermal fibroblasts. J Invest Dermatol. 1996 Oct;107(4):565-8.
- REYNOLDS JJ. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. Oral Dis. 1996 Mar;2(1):70-6
- RIDDERSTAD A, ABEDI-VALUGERDI M, MOLLER E. Cytokines in rheumatoid arthritis. Ann Med. 1991 Aug;23(3):219-23.
- RIDKER PM, CUSHMAN M, STAMPFER MJ, TRACY RP, HENNEKENS CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. N Engl J Med. 1997 Apr 3;336(14):973-9.
- RITCHLIN CT, HAAS-SMITH SA, LI P, HICKS DG, SCHWARZ EM. Mechanisms of TNF-alpha- and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. J Clin Invest. 2003 Mar;111(6):821-31.
- ROBERTS FA, MCCAFFERY KA, MICHALEK SM. Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodontitis. J Dent Res. 1997 Dec;76(12):1833-9.
- RODAN GA, MARTIN TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. Science. 2000 Sep 1;289(5484):1508-14.
- ROMAS E, GILLESPIE MT, MARTIN TJ. Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. Bone. 2002 Feb;30(2):340-6.
- ROSSI D, ZLOTNIK. The biology of chemokines and their receptors. Annu Rev Immunol 2000;18:217-242.
- ROSSOMANDO EF, KENNEDY JE, HADJIMICHAEL J. Tumour necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. Arch Oral Biol. 1990;35(6):431-4.
- ROT A, VON ANDRIAN UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. Annu Rev Immunol. 2004;22:891-928.
- ROUSSET F, GARCIA E, DEFRANCE T, PERONNE C, VEZZIO N, HSU DH, KASTELEIN R, MOORE KW, BANCHEREAU J.Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Mar 1;89(5):1890-3.
- RUBIN BY, ANDERSON SL, LUNN RM, SMITH LJ. Induction of proteins in interferon-alpha- and interferongamma-treated polymorphonuclear leukocytes. J Leukoc Biol. 1989 May;45(5):396-400.
- RYAN ME, RAMAMURTHY S, GOLUB LM. Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment. Curr Opin Periodontol. 1996;3:85-96.
- SABOKBAR A, KUDO O, ATHANASOU NA. Two distinct cellular mechanisms of osteoclast formation and bone resorption in periprosthetic osteolysis. J Orthop Res. 2003 Jan;21(1):73-80.
- SAIDENBERG-KERMANAC'H N, BESSIS N, LEMEITER D, DE VERNEJOUL MC, BOISSIER MC, COHEN-SOLAL M. Interleukin-4 cellular gene therapy and osteoprotegerin decrease inflammation-associated bone resorption in collagen-induced arthritis. J Clin Immunol. 2004 Jul;24(4):370-8.
- SAITO A, HOSAKA Y, NAKAGAWA T, SEIDA K, YAMADA S, TAKAZOE I, OKUDA K. Significance of serum antibody against surface antigens of Actinobacillus actinomycetemcomitans in patiets with adult periodontitis. Oral Microbiol Immunol.;8(3):146-153,1993.

- SAKAGUCHI S. Naturally Arising CD4+ Regulatory T Cells for Immunologic Self-Tolerance and Negative Control of Immune Responses. Annu Rev Immunol. 2004 Apr;22:531-562.
- SAKAMOTO M, TAKEUCHI Y, UMEDA M, ISHIKAWA I, BENNO Y. Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. Microbiol Immunol. 2001;45(1):39-44.
- SALAZAR-MATHER TP, HOKENESS KL. Calling in the troops: regulation of inflammatory cell trafficking through innate cytokine/chemokine networks. Viral Immunol. 2003; 16(3): 291-306.
- SALLUSTO F, LENIG D, MACKAY CR, LANZAVECCHIA A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. J Exp Med 1998;187:875-83.
- SALLUSTO F, MACKAY CR, LANZAVECCHIA. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. Immunol Today;19(12):568-574,1998.
- SALVI GE, BROWN CE, FUJIHASHI K, KIYONO H, SMITH FW, BECK JD, OFFENBACHER S. Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. J Periodont Res.;33(4):212-225,1998.
- SASAKI H, BALTO K, KAWASHIMA N, EASTCOTT J, HOSHINO K, AKIRA S, STASHENKO P. Gamma interferon (IFN-gamma) and IFN-gamma-inducing cytokines interleukin-12 (IL-12) and IL-18 do not augment infection-stimulated bone resorption in vivo. Clin Diagn Lab Immunol. 2004 Jan;11(1):106-10.
- SASAKI H, HOU L, BELANI A, WANG CY, UCHIYAMA T, MULLER R, STASHENKO P .- IL-10, but not IL-4, supresses infection-stimulated bone resorption in vivo. J Immunol.;165(7):3626-3630,2001.
- SASAKI H, OKAMATSU Y, KAWAI T, KENT R, TAUBMAN M, STASHENKO P. The interleukin-10 knockout mouse is highly susceptible to Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss. J Periodontal Res. 2004 Dec;39(6):432-41.
- SBORDONE L, BORTOLAIA C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. Clin Oral Investig. 2003 Dec;7(4):181-8.
- SCHRUM S, PROBST P, FLEISCHER B, ZIPFEL PF. Synthesis of the CC-chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, and RANTES is associated with a type 1 immune response. J Immunol.;157(8):3598-3604,1996.
- SCHULZE CJ, WANG W, SUAREZ-PINZON WL, SAWICKA J, SAWICKI G, SCHULZ R. Imbalance between tissue inhibitor of metalloproteinase-4 and matrix metalloproteinases during acute myocardial [correction of myoctardial] ischemia-reperfusion injury. Circulation. 2003 May 20;107(19):2487-92.
- SEBASTIANI S, ALBANESI C, DE PO, PUDDU P, CAVANI A, GIROLOMONI G. The role of chemokines in allergic contact dermatitis. Arch Dermatol Res. 2002 Jan; 293(11): 552-9
- SEDGWICK JD, RIMINTON DS, CYSTER JG, KORNER H. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. Immunol Today. 2000 Mar; 21(3): 110-3.
- SEGUIER S, GOGLY B, BODINEAU A, GODEAU G, BROUSSE N. Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cells and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival tissue? J Periodontol. 2001 Oct;72(10):1398-406.
- SEYMOUR GJ, GEMMELL E, WALSH LJ, POWELL RN. Immunohistological analysis of experimental gingivitis in humans. Clin Exp Immunol. 1988 Jan;71(1):132-7.
- SEYMOUR GJ, GEMMELL E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? Acta Odontol Scand.;59(3):167-73,2001
- SEYMOUR GJ, POWELL RN, DAVIES WI. Conversion of a stable T-cell lesion to a progressive B-cell lesion in the pathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: an hypothesis. J Clin Periodontol. 1979 Oct;6(5):267-77.

- SEZER O, HEIDER U, ZAVRSKI I, KUHNE CA, HOFBAUER LC. RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease. Blood. 2003 Mar 15;101(6):2094-8.
- SHALABY MR, AGGARWAL BB, RINDERKNECHT E, SVEDERSKY LP, FINKLE BS, PALLADINO MA JR. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. J Immunol. 1985 Sep;135(3):2069-73.
- SHANLEY TP, VASI N, DENENBERG A. Regulation of chemokine expression by IL-10 in lung inflammation. Cytokine. 2000 Jul;12(7):1054-64.
- SHILOH MU, MACMICKING JD, NICHOLSON S, BRAUSE JE, POTTER S, MARINO M, FANG F, DINAUER M, NATHAN C.Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. Immunity. 1999 Jan;10(1):29-38.
- NICHOLSON SC, GROBMYER SR, SHILOH MU, BRAUSE JE, POTTER S, MACMICKING JD, DINAUER MC, NATHAN CF. Lethality of endotoxin in mice genetically deficient in the respiratory burst oxidase, inducible nitric oxide synthase, or both. Shock. 1999 Apr;11(4):253-8.
- SIGUSCH B, KLINGER G, GLOCKMANN E, SIMON HU. Early-onset and adult periodontitis associated with abnormal cytokine production by activated T lymphocytes. J Periodontol. 1998 Oct;69(10):1098-104.
- SILVA JS, MACHADO FS, MARTINS GA. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. Front Biosci. 2003 May 1;8:s314-25.
- SINGH B, READ S, ASSEMAN C, MALMSTROM V, MOTTET C, STEPHENS LA, STEPANKOVA R, TLASKALOVA H, POWRIE F.. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. Immunol. Rev., 182, 190–200, 2001.
- SLADE GD, OFFENBACHER S, BECK JD, HEISS G, PANKOW JS. Acute-phase inflammatory response to periodontal disease in the US population. J Dent Res. 2000 Jan;79(1):49-57.
- SMITH PC, MUNOZ VC, COLLADOS L, OYARZUN AD. In situ detection of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in gingival epithelium in human periodontal disease.J Periodontal Res. 2004 Apr;39(2):87-92.
- SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002;28:12-55.
- SODEK J, OVERALL CM. Matrix metalloproteinases in periodontal tissue remodelling. Matrix Suppl. 1992;1:352-62.
- SOELL M, ELKAIM R, TENENBAUM H. CATHEPSIN C. Matrix metalloproteinases, and their tissue inhibitors in gingiva and gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. J Dent Res. 2002 Mar;81(3):174-8.
- SOGA Y, NISHIMURA F, OHYAMA H, MAEDA H, TAKASHIBA S, MURAYAMA Y. Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF-alpha) -1031/-863, -857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese. J Clin Periodontol. 2003 Jun;30(6):524-31.
- SONG F, ITO K, DENNING TL, KUNINGER D, PAPACONSTANTINOU J, GOURLEY W, KLIMPEL G, BALISH E, HOKANSON J, ERNST PB. Expression of the neutrophil chemokine KC in the colon of mice with enterocolitis and by intestinal epithelial cell lines: effects of flora and proinflammatory cytokines. J Immunol. 1999 Feb 15;162(4):2275-80.
- SOUTO JT, FIGUEIREDO F, FURLANETTO A, PFEFFER K, ROSSI MA, SILVA JS. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to Paracoccidioides brasiliensis infection in mice. Am J Pathol. 2000 May;156(5):1811-20.
- SOUZA MH, LEMOS HP, OLIVEIRA RB, CUNHA FQ. Gastric damage and granulocyte infiltration induced by indomethacin in tumour necrosis factor receptor 1 (TNF-R1) or inducible nitric oxide synthase (iNOS) deficient mice. Gut. 2004 Jun;53(6):791-6.

- SPITZNAGEL J JR, KRAIG E, KOLODRUBETZ D. Regulation of leukotoxin in leukotoxic and nonleukotoxic strains of Actinobacillus actinomycetemcomitans. Infect Immun. 1991 Apr;59(4):1394-401.
- STASHENKO P, DEWHIRST FE, PEROS WJ, KENT RL, AGO JM. Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. J Immunol. 1987 Mar 1;138(5):1464-8.
- STASHENKO P, JANDINSKI JJ, FUJIYOSHI P, RYNAR J, SOCRANSKY SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease.J Periodontol. 1991 Aug;62(8):504-9.
- STEINSHAMN S, BEMELMANS MH, VAN TITS LJ, BERGH K, BUURMAN WA, WAAGE A. TNF receptors in murine Candida albicans infection: evidence for an important role of TNF receptor p55 in antifungal defense. J Immunol. 1996 Sep 1;157(5):2155-9.
- STELZEL M, CONRADS G, PANKUWEIT S, MAISCH B, VOGT S, MOOSDORF R, FLORES-DE-JACOBY L. Detection of Porphyromonas gingivalis DNA in aortic tissue by PCR. J Periodontol. 2002 Aug;73(8):868-70.
- STERN J, SHAI E, ZAKS B, HALABI A, HOURI-HADDAD Y, SHAPIRA L, PALMON A. Reduced expression of gamma interferon in serum and marked lymphoid depletion induced by Porphyromonas gingivalis increase murine morbidity and mortality due to cytomegalovirus infection. Infect Immun. 2004 Oct;72(10):5791-8.
- STETSON DB, VOEHRINGER D, GROGAN JL, XU M, REINHARDT RL, SCHEU S, KELLY BL, LOCKSLEY RM. Th2 cells: orchestrating barrier immunity. Adv Immunol. 2004;83:163-89.
- SUSIN C, DALLA VECCHIA CF, OPPERMANN RV, HAUGEJORDEN O, ALBANDAR JM. Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. J Periodontol. 2004 Jul;75(7):1033-41.
- SWAIN SL. Interleukin 18: tipping the balance towards a T helper cell 1 response. J Exp Med. 2001 Aug 6;194(3):F11-4.
- SZABO SJ, SULLIVAN BM, PENG SL, GLIMCHER LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. Annu Rev Immunol. 2003; 21: 713-58.
- TAICHMAN NS, TSAI CC, BAEHNI PC, STOLLER N, MCARTHUR WP. Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. IV. In vitro release of lysosomal constituents from polymorphonuclear leukocytes exposed to supragingival and subgingival bacterial plaque. Infect Immun. 1977 Jun;16(3):1013-23.
- TAK PP, TAYLOR PC, BREEDVELD FC, SMEETS TJ, DAHA MR, KLUIN PM, MEINDERS AE, MAINI RN. Decrease in cellularity and expression of adhesion molecules by anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody treatment in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1996 Jul;39(7):1077-81.
- TAKAYANAGI H, KIM S, TANIGUCHI T. Signaling crosstalk between RANKL and interferons in osteoclast differentiation. Arthritis Res. 2002;4 Suppl 3:S227-32.
- TAKEICHI O, HABER J, KAWAI T, SMITH DJ, MORO I, TAUBMAN MA. Cytokine profiles of Tlymphocytes from gingival tissues with pathological pocketing. J Dent Res.;79(8):1548-55,2000.
- TALVANI A, RIBEIRO CS, ALIBERTI JC, MICHAILOWSKY V, SANTOS PV, MURTA SM, ROMANHA AJ, ALMEIDA IC, FARBER J, LANNES-VIEIRA J, SILVA JS, GAZZINELLI RT. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with Trypanosoma cruzi. Microbes Infect. 2000 Jul;2(8):851-66.

- TALVANI A, SANTANA G, BARCELOS LS, ISHII S, SHIMIZU T, ROMANHA AJ, SILVA JS, SOARES MB, TEIXEIRA MM. Experimental Trypanosoma cruzi infection in platelet-activating factor receptordeficient mice. Microbes Infect. 2003 Jul;5(9):789-96.
- TAMAI R, SAKUTA T, MATSUSHITA K, TORII M, TAKEUCHI O, AKIRA S, AKASHI S, ESPEVIK T, SUGAWARA S, TAKADA H. Human gingival CD14(+) fibroblasts primed with gamma interferon increase production of interleukin-8 in response to lipopolysaccharide through up-regulation of membrane CD14 and MyD88 mRNA expression. Infect Immun. 2002 Mar;70(3):1272-8.
- TANNER AC, HAFFER C, BRATTHALL GT, VISCONTI RA, SOCRANSKY SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. J Clin Periodontol. 1979 Oct;6(5):278-307.
- TAUBMAN MA, KAWAI T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. Crit Rev Oral Biol Med. 2001; 12(2): 125-35.
- TE VELDE AA, HUIJBENS RJ, HEIJE K, DE VRIES JE, FIGDOR CG. Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes. Blood. 1990 Oct 1;76(7):1392-7.
- TEITELBAUM SL. Bone resorption by osteoclasts. Science. 2000 Sep 1;289(5484):1504-8.
- TENG YT. Mixed periodontal Th1-Th2 cytokine profile in Actinobacillus actinomycetemcomitans-specific osteoprotegerin ligand (or RANK-L)- mediated alveolar bone destruction in vivo. Infect Immun. 2002 Sep;70(9):5269-73.
- TENG YT. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14(4):237-52.
- TENG YT, NGUYEN H, GAO X, KONG YY, GORCZYNSKI RM, SINGH B, ELLEN RP, PENNINGER JM. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. J Clin Invest. 2000 Sep;106(6):R59-67.
- TERVAHARTIALA T, PIRILA E, CEPONIS A, MAISI P, SALO T, TUTER G, KALLIO P, TORNWALL J, SRINIVAS R, KONTTINEN YT, SORSA T. The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2, -8, -13, and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. J Dent Res.;79(12):1969-77,2000.
- TESSIER PA, NACCACHE PH, CLARK-LEWIS I, GLADUE RP, NEOTE KS, MCCOLL SR. Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha. J Immunol. 1997 Oct 1;159(7):3595-602.
- THALMAIER U, LEHN N, PFEFFER K, STOLTE M, VIETH M, SCHNEIDER-BRACHERT W. Role of tumor necrosis factor alpha in Helicobacter pylori gastritis in tumor necrosis factor receptor 1-deficient mice. Infect Immun. 2002 Jun;70(6):3149-55.
- TIRANATHANAGUL S, PATTAMAPUN K, YONGCHAITRAKUL T, PAVASANT P. MMP-2 activation by Actinobacillus actinomycetemcomitans supernatant in human PDL cells was corresponded with reduction of TIMP-2. Oral Dis. 2004 Nov;10(6):383-8.
- TOKORO Y, MATSUKI Y, YAMAMOTO T, SUZUKI T, HARA K. Relevance of local Th2-type cytokine mRNA expression in immunocompetent infiltrates in inflamed gingival tissue to periodontal diseases. Clin Exp Immunol.;107(1):166-174,1997.
- TONETTI MS, IMBODEN MA, GERBER L, LANG NP, LAISSUE J, MUELLER C. Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. Infect Immun. 1994 Sep;62(9):4005-14.
- TOWNSEND TR, GILLENWATER JY. Urinary tract infection due to Actinobacillus actinomycetemcomitans. JAMA. 1969 Oct 20;210(3):558.

- TRINCHIERI G, PFLANZ S, KASTELEIN RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. Immunity. 2003 Nov;19(5):641-4.
- TUTER G, KURTIS B, SERDAR M. Effects of phase I periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1. J Periodontol. 2002 May;73(5):487-93.
- UDAGAWA N. The mechanism of osteoclast differentiation from macrophages: possible roles of T lymphocytes in osteoclastogenesis. J Bone Miner Metab. 2003;21(6):337-43.
- UKAI T, MORI Y, ONOYAMA M, HARA Y. Immunohistological study of interferon-g and interleukin-4bearing cells in human periodontitis gingiva. Arch Oral Biol.;46(10):901-908,2001.
- ULFGREN AK, ANDERSSON U, ENGSTROM M, KLARESKOG L, MAINI RN, TAYLOR PC. Systemic anti-tumor necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis down-regulates synovial tumor necrosis factor alpha synthesis. Arthritis Rheum. 2000 Nov;43(11):2391-6.
- VADAY GG, FRANITZA S, SCHOR H, HECHT I, BRILL A, CAHALON L, HERSHKOVIZ R, LIDER O. Combinatorial signals by inflammatory cytokines and chemokines mediate leukocyte interactions with extracellular matrix.J Leukoc Biol. 2001 Jun; 69(6): 885-92
- VAN DEN BERG WB. Lessons from animal models of arthritis. Curr Rheumatol Rep. 2002 Jun; 4(3): 232-9.
- VAN DER VEEN RC. Nitric oxide and T helper cell immunity. Int Immunopharmacol. 2001 Aug; 1(8): 1491-500.
- VAN DER ZEE E, EVERTS V, BEERTSEN W. Cytokines modulate routes of collagen breakdown. Review with special emphasis on mechanisms of collagen degradation in the periodontium and the burst hypothesis of periodontal disease progression. J Clin Periodontol. 1997 May;24(5):297-305.
- VAN DYKE TE, SERHAN CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. J Dent Res. 2003 Feb; 82(2): 82-90.
- VERVOORDELDONK MJ, TAK PP. Cytokines in rheumatoid arthritis. Curr Rheumatol Rep. 2002 Jun; 4(3): 208-17.
- VILKUNA-RAUTIAINEN T, PUSSINEN PJ, MATTILA K, VESANEN M, AHMAN H, DOGAN B, ASIKAINEN S. Antigenically diverse reference strains and autologous strains of Actinobacillus actinomycetemcomitans are equally efficient antigens in enzyme-linked immunosorbent assay analysis. J Clin Microbiol. 2002 Dec;40(12):4640-5.
- VISSE R, NAGASE H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res. 2003 May 2;92(8):827-39.
- WANG PL, OHURA K, FUJII T, OIDO-MORI M, KOWASHI Y, KIKUCHI M, SUETSUGU Y, TANAKA J. DNA microarray analysis of human gingival fibroblasts from healthy and inflammatory gingival tissues. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Jun 13;305(4):970-3.
- WATFORD WT, MORIGUCHI M, MORINOBU A, O'SHEA JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. Cytokine Growth Factor Rev. 2003 Oct;14(5):361-8.
- WERB Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. Cell. 1997 Nov 14;91(4):439-42.
- WIEBE CB, ADKINS CA, PUTNINS EE, HAKKINEN L, LARJAVA HS. Naturally occurring periodontal bone loss in the wild deer mouse, genus Peromyscus. J Periodontol. 2001 May;72(5):620-5.
- WILSON M, HENDERSON B. Virulence factors of Actinobacillus actinomycetemcomitans relevant to the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. FEMS Microbiol Rev.;17(4):365-79, 1995.
 Wynn TA. IL-13 effector functions. Annu Rev Immunol. 2003;21:425-56.

- XING Z. Current understanding of macrophage type 1 cytokine responses during intracellular infections. Histol Histopathol. 2000 Jan; 15(1): 199-205.
- YAMALIK N, CAGLAYAN F, KILINC K, KILINC A, TUMER C.The importance of data presentation regarding gingival crevicular fluid myeloperoxidase and elastase-like activity in periodontal disease and health status. J Periodontol. 2000 Mar;71(3):460-7.
- YAMAMOTO M, FUJIHASHI K, HIROI T, MCGHEE JR, VAN DYKE TE, KIYONO H. Molecular and cellular mechanisms for periodontal diseases: role of Th1 and Th2 type cytokines in induction of mucosal inflammation. J Periodontal Res.;32(1 Pt 2):115-9,1997.
- YAMASHITA U, KURODA E. Regulation of macrophage-derived chemokine (MDC, CCL22) production. Crit Rev Immunol. 2002;22(2):105-14.
- YAMAZAKI K, NAKAJIMA T, HARA K. Immunohistological analysis of T cell functional subsets in chronic inflammatory periodontal disease. Clin Exp Immunol. 1995 Mar;99(3):384-91.
- YAMAZAKI K, NAKAJIMA T, KUBOTA Y, GEMMELL E, SEYMOUR GJ, HARA K. Cytokine messenger RNA expression in chronic inflammatory periodontal disease. Oral Microbiol Immunol.;12(5):281-287,1997.
- YAMAZAKI K, YOSHIE H, SEYMOUR GJ. T cell regulation of the immune response to infection in periodontal diseases. Histol Histopathol. 2003 Jul;18(3):889-96.
- YOSHIHARA Y, NAKAMURA H, OBATA K, YAMADA H, HAYAKAWA T, FUJIKAWA K, OKADA Y. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. Ann Rheum Dis. 2000 Jun;59(6):455-61.
- ZHANG P, QUINTON LJ, BAGBY GJ, SUMMER WR, NELSON S. Interferon-gamma enhances the pulmonary CXC chemokine response to intratracheal lipopolysaccharide challenge. J Infect Dis. 2003 Jan 1;187(1):62-9.
- ZHOU M, OUYANG W. The function role of GATA-3 in Th1 and Th2 differentiation. Immunol Res. 2003;28(1):25-37.
- ZIJLSTRA EE, SWART GR, GODFROY FJ, DEGENER JE. Pericarditis, pneumonia and brain abscess due to a combined Actinomyces--Actinobacillus actinomycetemcomitans infection. J Infect. 1992 Jul;25(1):83-7.
- ZOU W, HAKIM I, TSCHOEP K, ENDRES S, BAR-SHAVIT Z. Tumor necrosis factor-alpha mediates RANK ligand stimulation of osteoclast differentiation by an autocrine mechanism. J Cell Biochem. 2001 Jun; 25;83(1):70-83.

Livros Grátis

(<u>http://www.livrosgratis.com.br</u>)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração Baixar livros de Agronomia Baixar livros de Arquitetura Baixar livros de Artes Baixar livros de Astronomia Baixar livros de Biologia Geral Baixar livros de Ciência da Computação Baixar livros de Ciência da Informação Baixar livros de Ciência Política Baixar livros de Ciências da Saúde Baixar livros de Comunicação Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE Baixar livros de Defesa civil Baixar livros de Direito Baixar livros de Direitos humanos Baixar livros de Economia Baixar livros de Economia Doméstica Baixar livros de Educação Baixar livros de Educação - Trânsito Baixar livros de Educação Física Baixar livros de Engenharia Aeroespacial Baixar livros de Farmácia Baixar livros de Filosofia Baixar livros de Física Baixar livros de Geociências Baixar livros de Geografia Baixar livros de História Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura Baixar livros de Literatura de Cordel Baixar livros de Literatura Infantil Baixar livros de Matemática Baixar livros de Medicina Baixar livros de Medicina Veterinária Baixar livros de Meio Ambiente Baixar livros de Meteorologia Baixar Monografias e TCC Baixar livros Multidisciplinar Baixar livros de Música Baixar livros de Psicologia Baixar livros de Química Baixar livros de Saúde Coletiva Baixar livros de Servico Social Baixar livros de Sociologia Baixar livros de Teologia Baixar livros de Trabalho Baixar livros de Turismo