

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA**

**Papel do receptor  $B_1$  de cininas na  
patogênese da periodontite experimental**

**Thais Gonçalves Zillo**

**São Paulo**

**2013**

# **Papel do receptor B<sub>1</sub> de cininas na patogênese da periodontite experimental**

**Thais Gonçalves Zillo**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Molecular do  
Departamento de Biofísica da Universidade  
Federal de São Paulo para a obtenção do  
título de Doutor em Ciências.**

**Área de Concentração: Biologia Molecular**

**Orientador: Prof. Dr. João Bosco Pesquero**

**São Paulo**

**2013**

## **Ficha catalográfica**

Zillo, Thais Gonçalves

Papel do receptor B<sub>1</sub> de cininas na patogênese da periodontite experimental/ Thais Gonçalves Zillo -- São Paulo, 2013.

58p.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular.

Título em inglês: The role of kinin B<sub>1</sub> receptor in the pathogenesis of experimental periodontitis.

1. Cininas

2. Periodontite

3. Receptor B1

4. Perda óssea

***Dedico este trabalho a todos os pacientes  
que sofrem com a doença periodontal.***

## ***Agradecimentos especiais***

*Aos meus pais, Arlete Maria Oliveira Gonçalves e Jerenaldo Teixeira Gonçalves, pelo amor com que formaram meu caráter e meus valores, pelo apoio a todas as minhas escolhas e principalmente, pela minha vida.*

*Ao meu marido, Marcello Zillo Neto pela forma companheira, compreensiva e amorosa com que me ajudou a vencer mais uma etapa da minha caminhada.*

*À minha família, os Oliveiras, Teixeiras, Gonçalves e Zillos, pelo amor e compreensão.*

*A Lívia Souza Pugliese pela dedicação com que me auxiliou em todas as etapas desse trabalho. A conterrânea, companheira de todas as horas, se tornou uma grande amiga.*

Muito obrigada!

## ***Agradecimentos***

*Ao Prof. Dr. João Bosco Pesquero, pela maneira simples, compreensiva e tranquila com que me orientou, me dando liberdade e crédito.*

*À Prof. Dra. Ieda Maria Longo Maugéri, pela preciosa colaboração que se estendeu numa amizade, me auxiliando “ombro a ombro” em experimentos e redações.*

*À Dra. Ana Carolina Monteiro, por ter entrado na minha vida através da ciência e por ter permanecido, como uma grande amiga.*

*A Vicência, pela valiosa colaboração, pela amizade e carinho.*

*Ao Prof. Dr. Marcelo Mori, pela colaboração paciente e fundamental.*

*A todos os integrantes do laboratório do Prof. João Bosco Pesquero, pelo apoio e ensinamentos, em especial, Carolina, Elice, Fabiana, Hugo (in memoriam), Paola Moraes, Valber e Valéria.*

*Aos amigos que foram além da convivência do laboratório: Elton, Erika, Juliana, Luara e Raphael, pela colaboração, apoio, amizade e por terem tornado tudo mais agradável.*

*A Suzana Macêdo de Oliveira, pela colaboração.*

*À Universidade Federal de São Paulo, seus funcionários e professores, pelo apoio.*

*Aos funcionários, professores e alunos do Departamento de Biofísica, pelo apoio.*

*Ao Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia e todos os seus integrantes, em especial ao Professor José Daniel Lopes, por ter me aceitado como uma “quase membro”, me dando acesso livre a todas as dependências do seu laboratório.*

*Às “meninas” do laboratório da Professora Ieda, em especial a Carla, Daniela, Juliana e Mônica, pelo apoio e amizade.*

*Aos bioteristas, em especial Emanuel pelo auxílio nos experimentos e cuidado com os animais.*

*Aos funcionários do CEDEME, pelo apoio e cuidado com os animais.*

*Às instituições de fomento, CNPq e FAPESP, pelo auxílio financeiro.*

*A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.*

Muito obrigada!

Mafalda, às vezes me pergunto:  
Qual o sentido da vida?

É na direção 5'-- > 3',  
Felipe!!!



*Quino*

## RESUMO

**Objetivo:** A patogênese da doença periodontal envolve diferentes aspectos da imunidade e da remodelação óssea. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o papel do receptor  $B_1$  de cininas ( $B_1R$ ) na periodontite experimental e osteoclastogênese.

**Material e Métodos:** Foi utilizado um modelo experimental de periodontite induzida por ligadura (PEX) em camundongos nocautes para o  $B_1R$  ( $B_1R^{-/-}$ ) para testar o papel deste receptor na modulação da perda óssea *in vivo*. A análise *ex vivo* dos linfonodos submandibulares confirmou a ativação do linfócitos T no modelo de ligadura. O efeito autônomo da deleção do  $B_1R$  foi avaliado em osteoclastos diferenciados a partir de precursores da medula óssea de camundongos. **Resultados:** Os camundongos  $B_1R^{-/-}$  exibiram aumento da perda óssea alveolar e aumento da secreção de interleucina (IL) - 17 *ex vivo* nos linfonodos submandibulares em resposta à PEX, quando comparados ao animal selvagem (Wt). A análise *ex vivo* dos linfonodos submandibulares revelou níveis de fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  reduzidos, enquanto a quantidade de interferon (IFN)- $\gamma$  permaneceu inalterada. A PEX, entretanto, não foi capaz de modificar os níveis de IL-10 em animais  $B_1R^{-/-}$ . Os osteoclastos de camundongos  $B_1R^{-/-}$  apresentaram aumento do número de células multinucleadas, positivas para a coloração com a fosfatase ácida resistente ao tartrato (TRAP<sup>+</sup>) quando comparado com o tipo selvagem. O uso de inibidor da enzima conversora de angiotensina, enzima que degrada cininas, como uma estratégia farmacológica para aumentar a disponibilidade de cininas, reduziu a destruição do osso em ratos e camundongos. **Conclusão:** Juntos, os nossos resultados indicam que o  $B_1R$  participa na patogênese da perda óssea induzida por ligadura, demonstrando, assim, o seu papel no desenvolvimento da doença periodontal.

PALAVRAS-CHAVE: CININAS;  $B_1R$ ; OSTEOCLASTOS; PERIODONTITE, PERDA ÓSSEA

## ABSTRACT

**Aim:** The pathophysiology of periodontal diseases involves different aspects of immunity and bone remodeling. Thus, the purpose of this study was to evaluate the role of kinin B<sub>1</sub> receptor (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>) in experimental periodontitis and osteoclastogenesis. **Material and Methods:** Here we used a model of ligature-induced experimental periodontitis (PEX) in mice lacking B<sub>1</sub>R (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>) to test the role of this receptor in modulating bone loss in vivo. Ex vivo analysis of submandible lymph nodes were used to confirm T lymphocyte activation. Autonomous effect of B<sub>1</sub>R deletion was evaluated in primary osteoclasts precursor from mouse bone marrow. **Results:** B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice exhibit increased bone loss and increased interleukin (IL)-17 secretion by lymphnode cells in response to PEX when compared to wild type, whereas tumor necrosis factor (TNF)-α levels were decreased and interferon (IFN)-γ remained unaltered. PEX failed to modify IL-10 levels in B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>. Osteoclasts from B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> mice also displayed increased differentiation into functional multinucleated tartrate-resistant acid phosphatase-positive (TRAP<sup>+</sup>) osteoclasts when compared to wild type. Furthermore, treatment of mice or rats with angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor, a pharmacological strategy to increase kinin availability once ACE degrades kinins into inactive peptides, could prevent bone destruction. **Conclusion:** Taken together, our results indicate that B<sub>1</sub>R participates in the pathogenesis of ligature-induced bone loss, thereby demonstrating its role in the development of periodontal disease.

KEY WORDS: KININ; B<sub>1</sub>R; OSTEOCLAST; PERIODONTITIS, BONE LOSS

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAP – American Dental Association

ANOVA - Análise de variância

APC – Célula apresentadora de antígeno

ARG-1 – Arginase 1

B<sub>1</sub>R – Receptor B<sub>1</sub> de cininas

B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> – Camundongo nocaute para o receptor B<sub>1</sub> de cininas

B<sub>2</sub>R – Receptor B<sub>2</sub> de cininas

B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> – Camundongo nocaute para o receptor B<sub>2</sub> de cininas

BK – Bradicinina

BSA – Albumina de soro bovino

c-maf – Proto-oncogene c de fibrossarcoma musculo-aponeurotico aviário

CATK – Catepsina K

cDNA – DNA complementar

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

CPM – Carboxipeptidase M

CPN – Carboxipeptidase N

CSF-1 - Fator estimulador de colônia de macrófagos

Ct – *Threshold cycle*

CTRL – Controle

CXCL – Ligante da quimiocina CXC

DALBK – des-Arg<sup>9</sup>-calidina

DBK – des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina

DC – Célula dendrítica

DC – Célula dendrítica

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EAE – Encefalomielite experimental

ECA – Enzima conversora de angiotensina

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

eNOS – NOS endotelial

ERK – Quinase regulada por sinal extracelular

FITC – Fluoresceína tiocianato

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GATA – Fator de transcrição trans-atuante específico de célula T

H&E – Hematoxilina e eosina

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

iECA – Inibidor da enzima conversora de angiotensina

IFN – Interferon

Ig – Imunoglobulina

IKK – Quinase dos inibidores de NF- $\kappa$ B

IL – Interleucina

JAK – Janus quinase ativada

JNK – Quinase c-Jun N-terminal

LBK – Calidina

LP – Ligamento periodontal

LPS – Lipopolissacarídeos

M-CSF – Fator estimulador de colônia de macrófagos

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno

MEM – Meio de cultura essencial mínimo

MMP – Metaloproteinases da matriz

Mn – Multinucleadas

MOG – Glicoproteína de oligodendrócito associada com a mielina

mRNA – RNA mensageiro

NaCl – Cloreto de sódio

NaOCl – Hipoclorito de sódio

NEP – Endopeptidase neutra

NO – óxido nítrico

NOD – Proteínas com domínio de ligação a nucleotídeos e oligomerização

NOS – óxido nítrico sintase

OA – Osso alveolar

OPG – Osteoprotegerina

OPGR – Ligante de OPG

PBS – Solução tampão salina-fosfato

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PE – Ficoeritrina

PEx – Periodontite experimental

PG – Prostaglandina

PMN – Neutrófilos polimorfonucleares

PMN – Neutrófilos polimorfonucleares

RANK – Receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B

RANKL – Ligante do receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B

RNA – Ácido ribonucleico

ROR - Receptor nuclear órfão relacionado ao ácido retinóico

RPMI – Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute

SNC – Sistema nervoso central

STAT – Proteína ativadora de transcrição e transdutora de sinal

T-bet – Fator de transcrição T-box

T<sub>h</sub> – Linfócito T *helper*

TI – Tecido inflamado

TLR – Receptores *toll-like*

TNF – Fator de necrose tumoral

TNFR – Receptor de TNF

TRAF6 – Fator 6 associado ao receptor de TNF

TRAP – Fosfatase ácida resistente ao tartrato

T<sub>reg</sub> – Células T regulatórias

Tyk2 – Tirosina quinase 2

Wt – Animais selvagens

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1 Periodonto normal.....	11
1.2 Alterações periodontais frente ao desafio microbiano .....	15
1.3 Cínicas e doenças periodontais .....	21
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
2.1 Objetivo geral.....	36
2.2 Objetivos específicos.....	36
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
3.1 Animais .....	37
3.2 Periodontite experimental e medidas de perda óssea .....	38
3.3 Produção de citocinas pelas células de linfonodos submandibulares .....	39
3.4 Tratamento com inibidor da ECA (iECA) .....	40
3.5 Cultura primária de osteoclastos .....	41
a. Enriquecimento da cultura de precursores de osteoclastos .....	41
b. Cultura de osteoclastos .....	42
c. Expressão gênica de arginase-1 (ARG-1) .....	43
3.6 Análise estatística.....	44
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
4.1 Aumento da perda óssea e secreção de IL-17 nos animais $B_1R^{-/-}$ durante a PEx .....	45
4.2 Os osteoclastos provenientes dos animais $B_1R^{-/-}$ são mais numerosos .....	48
4.3 Aumento da expressão de mRNA de ARG-1 .....	52
4.4 Redução da perda óssea induzida pela PEx após tratamento com maleato de enalapril.....	53
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>62</b>
<b>PUBLICAÇÕES</b> .....	<b>72</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Periodonto normal

O termo periodonto é derivado da língua grega e significa “em volta do dente”. Os tecidos periodontais, portanto, agrupam as estruturas que circundam o dente e conferem-lhe proteção e suporte (Figura 1.1). Compõem essa coletiva gengiva, cemento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar. Anatomicamente, a gengiva é descrita como periodonto de proteção e os demais tecidos como periodonto de sustentação (The American Academy of Periodontology-AAP, 2001).

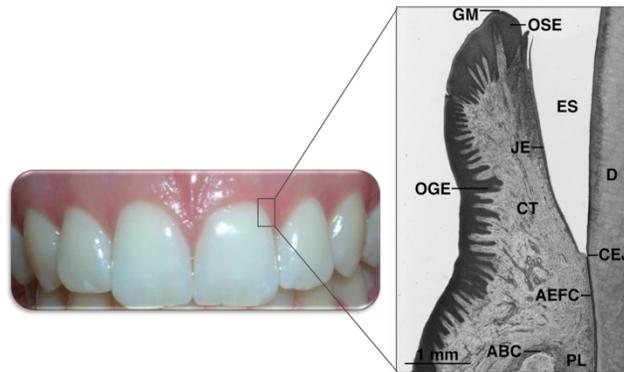


Figura 1.1 – À esquerda, fotografia de indivíduo saudável. À direita, microscopia de luz do periodonto humano jovem e clinicamente saudável. (GM: margem gengival; OSE: epitélio oral do sulco; OGE: epitélio oral gengival; JE: epitélio juncional; CT: tecido conjuntivo gengival; ES: esmalte dental; D: dentina; CEJ: junção cimento-esmalte; AEFC: cimento radicular; ABC: osso alveolar; PL: ligamento periodontal).

Fonte: Modificado de Bosshardt & Lang, 2005

O dente apresenta a característica única de ser um órgão mineralizado em contato direto com epitélio, sendo a gengiva a parte da mucosa mastigatória que recobre o

processo alveolar e circunda os dentes. O tecido epitelial da margem gengival pode ser diferenciado em três tipos: epitélio oral gengival, que fica voltado para a cavidade oral; epitélio oral do sulco, voltado para o dente, porém sem adesão; e epitélio juncional, que promove adesão entre a gengiva e o dente através de hemidesmossomos. O espaço virtual criado pela invaginação da margem da gengiva é denominado sulco gengival.

O sulco gengival é banhado pelo fluido gengival crevicular, transudato proveniente dos vasos sanguíneos do tecido conjuntivo subjacente e povoado por microrganismos (Buduneli & Kinane, 2011). O epitélio oral do sulco e o epitélio juncional, portanto, separam parcialmente o ambiente sulcular do tecido conjuntivo gengival, estendendo-se da junção cimento-esmalte até a margem da gengiva. A localização estratégica do epitélio juncional e a composição e dinâmica do fluido gengival crevicular permitem o controle do constante desafio infecto-inflamatório imposto pelos microrganismos residentes nessa região (Bosshardt & Lang, 2005; Buduneli & Kinane, 2011).

Em 2005, quando já haviam sido identificadas na boca mais de 700 espécies bacterianas, Aas *et al.* verificaram que um indivíduo pode carregar entre 34 e 72 diferentes espécies em distintos sítios da boca, sendo o ambiente subgengival responsável por abrigar de 11 a 32,8% dessa diversidade.

A massa bacteriana que se deposita nos dentes é chamada de placa dental ou placa bacteriana. Frequentemente, a placa sofre mineralização, resultando em depósitos duros aderidos ao dente, denominados cálculo dental, que proporcionam mais retenção de placa e conseqüentemente mais formação de cálculo (AAP, 2001). A complexidade da microbiota periodontal foi observada no final do século XVII quando van Leeuwenhoek visualizou ao microscópio, construído por ele mesmo, o que chamou de animáculos retirados da superfície dos seus próprios dentes (Slavikin, 1997). Tempos depois, no século XIX, Robert Koch apresentou seus postulados baseados no paradigma uma-doença/uma-bactéria. Desde então diversos estudos avaliaram a composição da placa e sua organização em busca do patógeno responsável pela doença em meio à massa

microbiana. Como esse microrganismo jamais foi identificado, outras causas para doença foram propostas, como trauma e atrofia por desuso (Darveau, 2010). Finalmente, percebeu-se que a inflamação gengival era revertida com a remoção mecânica diária da placa, o que deu força às discussões que levaram à hipótese da “placa inespecífica” extensamente ventilada nos anos 1950. A premissa dessa hipótese é que a quantidade de bactérias presente na placa era mais importante que as espécies presentes nela (Theilade, 1996). Em 1965, Løe *et al.* provocaram inflamação gengival em humanos através da suspensão dos mecanismos de higiene oral por 21 dias. Pela primeira vez comprovou-se que a alteração do estado de saúde da gengiva está diretamente relacionada ao acúmulo de placa e que a remoção dos depósitos bacterianos resulta em reversão do quadro inflamatório. Com o tempo de acúmulo de placa, observaram-se também mudanças no perfil microbiano, indicando a associação de certas espécies com o estágio da inflamação. Esse modelo acusou os depósitos bacterianos como causa primária da inflamação gengival e resultou no abandono de conceitos que envolvem causas não bacterianas como trauma oclusal e dieta.

Do mesmo modo que em outras doenças polimicrobianas, na doença periodontal a microbiota é dinâmica. Na transição de saúde para doença periodontal foi observada a mudança no predomínio de espécies Gram-positivas para Gram-negativas. O trabalho de Socransky *et al.* em 1998 revelou que diversos grupos bacterianos estão associados com saúde ou com doença. Nesse estudo os grupos foram chamados de “complexos” e apelidados com nomes de cores (Figura 1.2). O complexo vermelho de Socransky, composto por *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, era encontrado na maioria dos sítios doentes mais tardiamente na sucessão microbiana e foi fortemente associado à doença. As bactérias que compõem esse grupo foram chamadas de patógenos suspeitos.

Apenas recentemente, na década de 1990, a placa bacteriana foi reconhecida como biofilme (Costerton *et al.* 1994; Thomas & Nakaishi, 2011), quase 60 anos após a identificação do biofilme por ZoBell & Anderson, em 1936. Donlan & Costerton (2002) apontaram os seus mecanismos de sobrevivência e possíveis implicações clínicas ao

descrever o biofilme como “uma comunidade microbiana sésil caracterizada por células que são irreversivelmente ligadas a um substrato ou umas às outras, incorporadas em uma matriz de polímero extracelular produzida por elas mesmas, com fenótipos distintos no que diz respeito à taxa de crescimento e transcrição de genes”. Esse conhecimento alinhado ao trabalho de Socransky *et al.* (1998) conceitua, atualmente, a microbiota periodontal como um biofilme composto por pelo menos cinco grupos distintos com relações específicas entre eles.

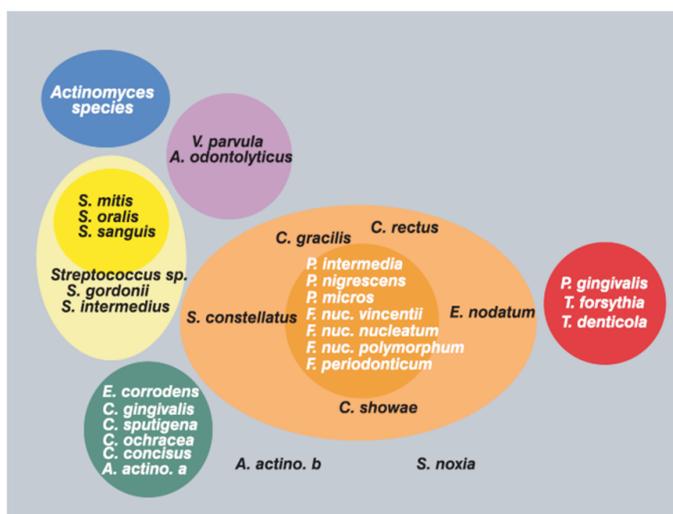


Figura 1.2 – Diagrama representativo das relações das espécies dentro dos complexos microbianos e dos complexos microbianos entre si.

Fonte: Socransky *et al.* (1998)

A recente caracterização da microbiota periodontal como um biofilme e o crescente entendimento da natureza dos biofilmes foram alguns dos mais importantes avanços conceituais da microbiologia periodontal em anos. O comportamento das bactérias em biofilme é diferente daquele observado em culturas planctônicas. No biofilme, as bactérias apresentam uma estrutura complexa, que contém um sistema circulatório primitivo e um microambiente que difere do ambiente da cavidade bucal em

pH e disponibilidade de oxigênio e nutrientes, conferindo-lhes resistência às defesas do hospedeiro e aos agentes antimicrobianos (Page *et al.*, 1997). Apesar do amplo conhecimento atual, a microbiologia periodontal permanece um campo fértil para pesquisa, pois mesmo frente ao seu claro envolvimento na etiologia da doença periodontal, os fatores determinantes de padrão de colonização e patogenicidade ainda não estão completamente elucidados.

## **1.2 Alterações periodontais frente ao desafio microbiano**

Paralelamente aos estudos da microbiota periodontal, as alterações gengivais que acompanham as alterações microbianas foram também investigadas. No final dos anos 1960 até meados dos anos 1970 alguns estudos foram publicados, indicando que mesmo a gengiva saudável contém um pequeno, mas definido, infiltrado de células inflamatórias. Suportados por esses dados, Lindhe & Rylander (1975) submeteram cães da raça Beagle ao acúmulo de placa após terem sido mantidos sob rigoroso programa de higiene dental desde o desmame até os 10 meses de vida. Por 28 dias experimentais foi oferecida aos cães uma dieta pastosa, que permitiu o acúmulo de placa e cálculo. As alterações gengivais foram detalhadamente descritas nesse estudo. Aos quatro dias era possível detectar placa com auxílio de sonda, com presença de exsudato gengival. No dia 14, um grande volume de placa havia sido depositado na superfície dental dos cães, acompanhado de aumento do exsudato gengival. Ao final do experimento, no dia 28, a gengiva dos cães apresentava-se vermelha e edematosa, com sangramento à sondagem. No dia 0, aproximadamente 1% do volume do epitélio juncional era composto por leucócitos. Ao final do experimento, o número de leucócitos no epitélio juncional representava 2,4%, sendo nesse tempo a população de células polimorfonucleares neutrofilicas predominante, englobando 67% dos leucócitos. O volume de leucócitos mononucleares foi aumentando gradualmente no período experimental, chegando a ocupar 10% do volume da biópsia de tecido conjuntivo ao final do experimento. O volume ocupado por vasos sanguíneos, que era inicialmente de 7%, alcançou o pico

máximo no dia 4, representando 22% do volume de tecido conjuntivo. Ao final do período experimental os vasos sanguíneos ocupavam 16% do volume total de tecido conjuntivo gengival, justificando a observação clínica de inflamação gengival.

A partir desses conhecimentos, considera-se que a quebra do equilíbrio entre as bactérias residentes do sulco e o tecido gengival resulta no aumento do processo inflamatório, até então ativo porém subclínico, e surgimento dos sintomas do que é conhecido genericamente como doença periodontal (Darveau, 2010).

“Doença periodontal” é um termo atribuído à inflamação dos tecidos de proteção e suporte do dente, seja ela induzida pela placa bacteriana ou por infecções específicas, de origem bacteriana, viral ou fúngica, bem como por produtos químicos (Armitage, 1999). No caso das doenças induzidas por placa, sua presença está relacionada à doença em diferentes sítios e com severidade variada, enquanto a redução da carga bacteriana é frequentemente compatível com tecidos periodontais saudáveis (Løe *et al.*, 1965; Cobb, 2002; Thomas & Nakaishi, 2011).

As manifestações clínicas da doença variam enormemente, desde discreta inflamação nos tecidos gengivais em poucas áreas da boca até destruição óssea periodontal severa generalizada. A inflamação relacionada à placa bacteriana restrita à gengiva é denominada gengivite, enquanto periodontite refere-se ao comprometimento adicional dos tecidos de suporte (AAP, 2001). Como consequência do acúmulo de placa ocorre o aumento da distância entre a junção cimento-esmalte e porção apical do epitélio juncional, ou nível clínico de inserção, resultando na formação de bolsa periodontal, retração gengival, além de mobilidade dental, comprometimento da função e perda dental em casos extremos (Armitage, 2003).

A periodontite é subdividida em duas principais formas de acometimento. A periodontite crônica, relacionada diretamente com acúmulo de placa e cálculo (Figura 1.3); e a periodontite agressiva, na qual a perda de inserção periodontal é muitas vezes incompatível com o volume de placa (Figura 1.4), porém relacionada à presença de

bactérias com fatores de virulência potentes em indivíduo suscetível (Armitage, 1999).  
As duas formas da doença podem se sobrepor, dificultando o diagnóstico clínico.



Figura 1.3 – À esquerda, fotografia de um indivíduo com periodontite crônica, com grande depósito de placa e cálculo na superfície dos dentes. À direita, radiografias periapicais do mesmo indivíduo, revelando perda óssea alveolar (indicada por setas). Imagens gentilmente cedidas por Doutora Beatriz de Brito Bezerra.



Figura 1.4 – À esquerda, fotografia de um indivíduo com periodontite agressiva, com poucos depósitos de placa e cálculo na superfície dos dentes. À direita, radiografias periapicais do mesmo indivíduo, revelando perda óssea alveolar (indicada por setas). Imagens gentilmente cedidas por Professor Doutor Lúcio Flávio Teixeira Damis.

A periodontite crônica caracteriza-se pela maior prevalência em adultos e perda de inserção lenta com surtos de progressão rápida. O acúmulo de biofilme, presença de cálculo e fatores locais são consistentes com a destruição periodontal, que pode ser modificada por alterações sistêmicas como diabetes e tabagismo. A forma agressiva da periodontite, por outro lado, acomete indivíduos saudáveis, com perda de inserção rápida e destruição óssea severa em tenra idade (Research, Science and Therapy Committee of The American Academy of Periodontology, 1999).

Apesar da etiologia bacteriana bem descrita, a patogênese das diversas formas de doença periodontal continua obscura (Kinane *et al.*, 2011). A observação dos diferentes padrões de progressão de doença teve início em 1986 quando Løe *et al.* publicaram o acompanhamento de 15 anos de uma população sem qualquer hábito de higiene oral ou assistência odontológica, etnicamente e socioeconomicamente homogênea. Esse estudo demonstrou que, na maioria da população, em torno de 81% dos indivíduos avaliados, a periodontite progride lentamente, com perda de inserção moderada. Aproximadamente 11% da população estudada não apresentou qualquer progressão de doença, mantendo-se sem perda de inserção durante os 15 anos de preservação. Os restantes 8% sofreram perdas de inserção rápidas, que resultaram na perda dental média de 2,3 dentes ao ano, contra 0,27 dentes ao ano da população pertencente ao grupo com progressão moderada. Concluiu-se que as bactérias são, portanto, necessárias mas não suficientes para o desenvolvimento e progressão da doença periodontal (Graves *et al.*, 2003). Essa interação microrganismo-hospedeiro não foi ainda completamente explicada ou reproduzida. Permanece, portanto, inquietando os pesquisadores a noção de que nem todas as pessoas ou bolsas periodontais são nichos acomodatórios para as bactérias.

A busca pela identificação dos fatores que tornariam um hospedeiro suscetível alavancou o campo de pesquisa da patogênese da doença periodontal. Os fatores genéticos e comportamentais que podem participar da manutenção da saúde ou início e progressão da doença vêm sendo descritos (Heitz-Mayfield, 2005; Schenkein, 2006; Kornman, 2008) e assim foram gerados conceitos a respeito dos diversos modificadores da doença, tais como: (i) a redução do número e/ou função de neutrófilos geralmente

resulta em avanço da doença periodontal; (ii) drogas como fenitoína, nifedipina e ciclosporina predispõem ao aumento do volume de gengiva em resposta à placa; (iii) as alterações hormonais femininas alteram o curso da gengivite sem predispor à perda de inserção; (iv) a terapia imunossupressora ou imunossupressão induzida pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) podem predispor o indivíduo à destruição periodontal; (v) a hiperglicemia crônica no diabetes mal controlado eleva a prevalência e severidade da doença; e finalmente (vi) o hábito de fumar aumenta a prevalência e severidade da doença, além de aumentar o insucesso terapêutico. Os dois últimos conceitos se referem a fatores (diabetes mal controlado e tabagismo) cujas evidências de participação no curso da doença periodontal são as mais bem estabelecidas (Kinane, 1999).

Ainda que considerando o impacto dos fatores de risco, a atenção dos pesquisadores durante décadas se voltou aos mecanismos da resposta do hospedeiro ligados à função de células da imunidade inata e ao metabolismo de citocinas e mediadores inflamatórios, especialmente de interleucina (IL)-1 $\beta$ , fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e prostaglandina (PG)E<sub>2</sub> (Kinane *et al.*, 2011; Preshaw & Taylor, 2011). Essas citocinas são produzidas por uma variedade de tipos celulares, incluindo macrófagos, monócitos, células dendríticas (DCs), osteoblastos, células do ligamento periodontal, fibroblastos gengivais, células epiteliais e endoteliais (Haynes *et al.*, 1999).

Na segunda metade dos anos 1990, as células polimorfonucleares neutrófilos (PMN) e os monócitos/macrófagos eram consideradas as peças-chave da patogênese da periodontite. Embora a função ambígua dos neutrófilos fosse reconhecida (Weiss, 1989; Gainet *et al.*, 1998; Nussbaum & Shapira, 2011), essas células eram consideradas protetoras de primeira linha de defesa, por formarem uma barreira entre o epitélio juncional e o tecido conjuntivo e por serem capazes de migrar para a região sulcular onde confrontam as bactérias (Bosshardt & Lang, 2005). A contagem normal de células e funcionalidade dos neutrófilos eram consideradas condições *sine qua non* para a perfeita montagem da resposta do hospedeiro (Page *et al.*, 1997), embora sua maquinaria antimicrobiana juntamente com sua apoptose retardada pudessem destituí-los da posição de defensor para a de agressor. Por outro lado, a ativação de macrófagos por

lipopolissacarídeos (LPS), e consequente produção de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , metaloproteinases da matriz (MMP) e PGE<sub>2</sub>, era o mecanismo descrito (Figura 1.5) no qual a inflamação e a ativação de células residentes como fibroblastos, osteoblastos, células epiteliais e células do endotélio vascular respondiam pelo dano causado ao periodonto estimulado pelas bactérias (Page *et al.*, 1997; Kornman, 2008).

Ampliando os efeitos da ativação da imunidade inata, a indução de mediadores primários como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  estimula a produção de mediadores secundários, como quimiocinas e cicloxigenase. Esta última está envolvida na produção de prostaglandinas, amplificando os diversos efeitos inflamatórios e imunorregulatórios, tais como o estímulo direto dos fibroblastos a produzir colagenase, indução de apoptose de fibroblastos e osteoblastos e estímulo à reabsorção óssea (Graves & Cochran, 2003; Erdemir *et al.*, 2004). Além disso, a ativação da resposta inflamatória e liberação de mediadores químicos nos tecidos resulta também na liberação de bradicinina (BK), como consequência da ativação do complemento e da cascata da coagulação, pela ação da calicreína sobre o substrato cininogênio (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005).

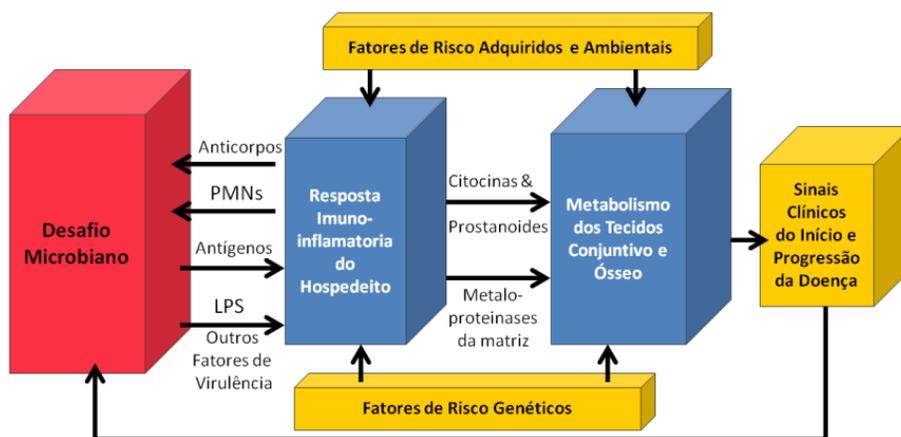


Figura 1.5 – Modelo de patogênese de 1997, demonstrando diversos fatores que contribuem para o desenvolvimento da periodontite, baseado nos processos e vias conhecidas na época.

Fonte: Kornman, 2008 – traduzido do inglês.

### 1.3 Cininas e doença periodontal

A BK (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) faz parte de um grupo de peptídeos denominados cininas. As cininas são moléculas efetoras que não são produzidas e liberadas por células, mas pela clivagem de cininogênios circulante e tecidual (cininogênio de alto peso molecular, HMWK e cininogênio de baixo peso molecular, LMWK) catalisada pelas caliceínas plasmática ou tecidual, respectivamente (Regoli & Barabé, 1980). As cininas BK e LBK (calidina) ligam-se ao receptor B<sub>2</sub>, enquanto a DBK (des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina) e a DALBK (des-Arg<sup>9</sup>-calidina), respectivamente, produtos da clivagem da BK e da calidina pelas carboxipeptidases (cininase do tipo I), ligam-se preferencialmente ao receptor induzível B<sub>1</sub> (Regoli & Barabé, 1980; Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). A enzima conversora de angiotensina (ECA) e as NEP (endopeptidases neutras) atenuam a ação das cininas degradando-as em fragmentos inativos (Figura 1.6) (Lerner, 1994; Leeb-Lundberg *et al.*, 2005).

As cininas atuam através da ativação de dois receptores ligados à proteína G, denominados B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Os receptores de cininas são típicos receptores acoplados à proteína G, constituídos por uma única cadeia polipeptídica que atravessa a membrana plasmática sete vezes, sendo o domínio N-terminal extracelular e o domínio C-terminal intracelular. Esses receptores estão presentes em diferentes espécies de mamíferos, como humanos, macacos, ratos, coelhos e outros. Nos seres humanos, os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> são homólogos, preservando 36% de identidade dos aminoácidos e são codificados por genes de três exons. Em humanos, os genes dos receptores B<sub>1</sub> e do B<sub>2</sub> estão localizados sequencialmente (direção 5'), separados por apenas 12 kb no cromossomo 14q32 (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005).

Os receptores B<sub>2</sub> são expressos constitutivamente e amplamente distribuídos pelos tecidos. Estudos farmacológicos demonstraram a presença de receptores B<sub>2</sub> em fibroblastos de gengiva e de polpa dental humana. Nessas culturas, a BK estimula a produção de IL-8, importante citocina quimiotática para neutrófilos que constituem a primeira linha de defesa do periodonto (Brunius *et al.*, 2005). Outros efeitos mediados

pelo receptor B<sub>2</sub> incluem a estimulação da proliferação celular, liberação de citocinas, prostaciclina e óxido nítrico (NO).

#### Sistema Calicreína-cininas

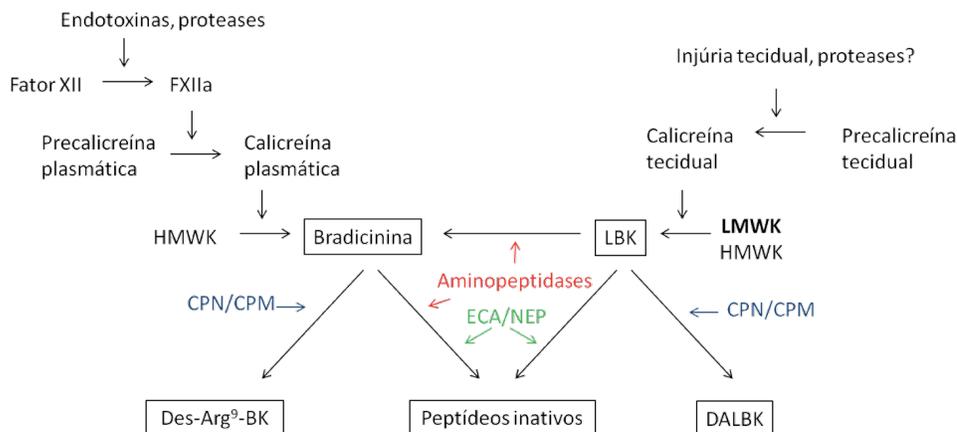


Figura 1.6 – Representação esquemática do sistema calicreína-cininas. Na circulação, o FXIIa (fator XII ativo) atua sobre a calicreína, que libera a bradicinina a partir do HMWK (cininogênio de alto peso molecular). A bradicinina, agonista do receptor B<sub>2</sub>, pode ser clivada pelas cininases CPN e CPM (carboxipeptidases N e M respectivamente) gerando des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina, que é o principal agonista do receptor B<sub>1</sub>. Nos tecidos, o LMWK (cininogênio de baixo peso molecular) é clivado pela calicreína tecidual, gerada a partir da precalicreína tecidual, dando origem a LBK (lisil-bradicinina ou calidina). Do mesmo modo que a BK, a LBK, também agonista do receptor B<sub>2</sub>, pode ser clivada pelas cininases CPN e CPM (carboxipeptidases N e M respectivamente) gerando DALBK (des-Arg<sup>9</sup>-calidina), agonista do receptor B<sub>1</sub>. A ECA (enzima conversora de angiotensina) e outras enzimas como aminopeptidases e a NEP (endopeptidase neutra) degradam as cininas, gerando peptídeos inativos.

Fonte: Baseado no texto de Leeb-Lundberg *et al.*, 2005.

Os receptores B<sub>1</sub> são expressos em baixos níveis em condições normais, podendo contudo ter a sua expressão aumentada *in vivo* e *in vitro* por fatores como endotoxinas, fatores de crescimento e citocinas como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  via NF- $\kappa$ B, sugerindo a participação desses receptores em estados de inflamação e trauma *in vivo* (Brechtler *et al.*, 2008). A expressão constitutiva do receptor B<sub>1</sub> tem sido demonstrada em células de músculo liso mesentérico e de artéria renal de coelho (Rhaleb *et al.*, 1989), estômago (Allogho *et al.*, 1995), em alguns órgãos de camundongo tais como rim, pulmão, coração e fígado (Pesquero *et al.*, 1996), e algumas células como neutrófilos (Araújo *et al.*, 2001) e osteoblastos MC3T3-E1 (Ljunggren & Lerner, 1990). Por outro lado, também foi demonstrada a indução do aumento da expressão de mRNA tanto do receptor B<sub>1</sub> quanto do receptor B<sub>2</sub>. Em células de linhagem osteoblástica humana MG-63, fibroblastos humanos e osteoblastos de camundongo, tanto a citocina IL-1 $\beta$  como TNF- $\alpha$  serviram de estímulo para o aumento induzido da expressão de mRNA de ambos os receptores (Brechtler *et al.*, 2008).

Vários mecanismos de transdução de sinal tem sido descritos para as cininas, dependendo do tipo celular. Através da via da fosfolipase C (pela ativação de G<sub>q</sub>), a ativação dos receptores de cininas resulta na geração de inositol 3-fosfato e consequente mobilização de cálcio intracelular. Através da via da fosfolipase A2 (ativado através de G<sub>i</sub> ou mecanismos dependentes de cálcio) ocorre liberação de ácido araquidônico e produção de NO, também pela ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). O receptor B<sub>2</sub> também pode interagir diretamente com outros eNOS de forma independente da proteína G (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005).

A BK promove a fosforilação transiente de MAP quinase e ativa as vias Janus quinase ativada/STAT (JAK-STAT). Isso envolve a fosforilação da tirosina quinase 2 (Tyk2) e STAT3 seguido da translocação nuclear de STAT3. O receptor B<sub>2</sub> ativa vários fatores de transcrição que regulam a indução de diversas citocinas envolvidas na lesão tecidual e inflamação, bem como a indução da expressão do receptor B<sub>1</sub> (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005).

Os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> formam homodímeros e podem, espontaneamente, formar heterodímeros. A heterodimerização foi associada a uma degradação proteolítica específica do receptor B<sub>2</sub> e um aumento da sinalização dependente ou não do agonista no complexo heterólogo. Recentemente, foi relatada a existência de um heterodímero receptor B<sub>2</sub>/receptor de angiotensina 1, com impacto no controle da pressão arterial através da modulação da atividade da ECA (Sabatini *et al.*, 2008).

A função do receptor B<sub>2</sub> é controlada por mecanismos de curto prazo que envolvem a rápida dissociação do ligante, dessensibilização ou internalização do receptor. Após a estimulação de longo prazo, ocorre regulação negativa da expressão do receptor. Em contraste, o receptor B<sub>1</sub> elicita respostas e sinalização persistentes, submetidas a mecanismos limitados de internalização e dessensibilização, com dissociação muito lenta do ligante (Couture *et al.*, 2001).

Até meados dos anos 1990 as cininas eram mais conhecidas pelos seus efeitos de vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e dor (Regoli & Barabé, 1980). Entretanto, seu papel nas respostas inflamatórias das doenças orais já vinha sendo explorado. No início dos anos 1990, foi demonstrado o aumento dos níveis de ativadores do plasminogênio, proteases associadas com o sistema fibrinolítico, no fluido gengival de paciente com gengivite e periodontite. Como o fator XIIa é um fator-chave que também estimula o sistema fibrinolítico, sugeriu-se que a cascata de coagulação e o sistema calicreína-cininas estavam ativados na doença periodontal (Schmid *et al.*, 1991). Dentro desse contexto, a literatura acerca do papel das cininas na patogênese da doença periodontal vem sendo gradativamente moldada, principalmente pelo grupo sueco liderado pelo Doutor Ulf Lerner. Gustafson & Lerner (1984) publicaram uma das primeiras evidências do papel das cininas no metabolismo ósseo. Nesse trabalho, a BK foi capaz de estimular a mobilização mineral e liberação de enzimas lisossomais em cultura de ossos provenientes da calota craniana de ratos neonatos. Especulou-se que a geração concomitante de trombina e de BK em áreas de trauma e inflamação podem induzir a reabsorção de tecido ósseo vizinho.

Outros trabalhos do mesmo grupo foram publicados, utilizando basicamente o mesmo método com diferentes cininas. Nesses trabalhos, os efeitos das cininas foram abolidos por inibidores da formação de prostaglandina, reforçando a teoria de que as cininas estimulam a reabsorção óssea, de modo dependente de PGE<sub>2</sub> (Gustafson & Lerner, 1984; Ljunggren & Lerner, 1990; Lerner, 1994). Além disso, foi descrito que a BK é capaz de potencializar sinergisticamente a produção de PGE<sub>2</sub> induzida por IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em fibroblastos de polpa dental (Sundqvist & Lerner, 1996), e de amplificar os efeitos estimulatórios da IL-1 $\beta$  sobre a produção de PGE<sub>2</sub> e da reabsorção óssea de calvária de camundongos neonatos (Lerner, 1991).

No periodonto, o clímax da resposta imune ao desafio microbiano é a perda de inserção que caracteriza a periodontite. A perda de inserção, identificada clinicamente pela formação de bolsa, retração gengival ou associação dos dois sinais clínicos, é o resultado da migração apical do epitélio juncional e perda óssea (AAP, 1999). A reabsorção óssea é consequência da ativação de osteoclastos, células multinucleadas formadas pela fusão de precursores da linhagem hematopoiética que expressam o receptor ativador de NF- $\kappa$ B (RANK) em sua superfície (Boyce & Xing, 2007). Os mecanismos moleculares por trás da interação célula-célula que regulam a reabsorção óssea foram elucidados somente no final dos anos 1990.

Dos três protagonistas da regulação da osteoclastogênese, o primeiro a ser descrito foi a osteoprotegerina (OPG). Simonet *et al.* (1997) descobriram a OPG por acaso, enquanto estudavam membros da superfamília de receptores de TNF (TNFR). Desenvolveram, para esse fim, camundongos transgênicos que superexpressam diversos DNAs complementares (cDNAs) de diferentes TNFRs. O camundongo transgênico superexpressando um cDNA em particular exibiu aumento generalizado da densidade óssea, associado com a redução do número de osteoclastos. Os autores batizaram esse TNFR de osteoprotegerina, isto é, protetor do osso. Efeitos similares foram obtidos com a proteína recombinante, administrada em camundongos normais, além de proteger ratas ovariectomizadas contra perda óssea. Demonstraram também que, *in vitro*, a OPG é capaz de bloquear a osteoclastogênese de maneira dose-dependente. Os autores

formularam a hipótese de que a OPG neutralizaria um fator, até então desconhecido, que estimularia o desenvolvimento de osteoclastos e por isso foi chamada de receptor “armadilha”. Essa hipótese foi confirmada pelo mesmo grupo, no ano seguinte.

Em 1998, Lacey *et al.* utilizaram a OPG como uma sonda e assim identificaram seu ligante. Essa proteína foi chamada de ligante de OPG (OPGL), apresentada nas formas transmembrana tipo II (na qual a porção N-terminal é intracelular) e solúvel, clivada por proteólise. Foi demonstrado que OPGL, atualmente conhecida como RANKL, é uma citocina relacionada a TNF que ativa os osteoclastos já maduros e modula a formação de osteoclastos a partir de seus precursores na presença do fator de crescimento CSF-1 (ou M-CSF), independente de vitamina D<sub>3</sub> e células do estroma (Boyle *et al.*, 2003). Assim, foi estabelecido que RANKL é um potente indutor de reabsorção óssea ao ligar-se à superfície de progenitores de osteoclastos provenientes principalmente da medula óssea, previamente tratados com M-CSF. Desde então, três isoformas de RANKL foram identificadas em camundongos (Ikeda *et al.*, 2001), com capacidade de multimerizar. A interação entre as três isoformas resulta em múltiplas funções de RANKL, como diferenciação e fusão de células precursoras de osteoclastos e ativação e sobrevivência de osteoclastos (Ikeda *et al.*, 2003). Foi demonstrado ainda, no mesmo trabalho de Ikeda *et al.* (2003), que a terceira isoforma de RANKL pode ser um regulador do metabolismo ósseo, inibindo a fusão de preosteoclastos.

Em 1998, os mecanismos de ação da proteína RANKL, então chamada OPGL, permaneciam desconhecidos. Especulava-se que OPGL ligava-se a um receptor de superfície celular que iniciaria a cascata de transdução de sinal. Em um precursor apropriado, essa cascata de sinalização resultaria na diferenciação e/ou ativação de osteoclastos. Diante dessa especulação, Hsu *et al.* (1999) examinaram a expressão gênica de precursores de osteoclastos em modelo murino. Desse modo, identificaram e caracterizaram em murinos o receptor que está presente em progenitores de osteoclastos e que medeia a diferenciação e ativação dessas células, induzida por OPGL. O receptor identificado é uma proteína relacionada a TNFR idêntica à RANK, proteína de superfície

de células dendríticas previamente reportada em 1997 por Anderson *et al.*, cuja ativação resulta no surgimento de osteoclastos maduros.

Os osteoclastos maduros são células multinucleadas, que expressam genes que codificam fosfatase ácida resistente ao tartrato (TRAP), catepsina K (CATK), receptor de calcitonina e integrina  $\beta_3$  (Boyle *et al.*, 2003). O corpo celular do osteoclasto é polarizado, em resposta a ativação de RANK por seu ligante (Burgess *et al.*, 1999), com rearranjo do citoesqueleto de actina e formação de um compartimento selado. Esse “vacúolo externo” é então acidificado pela liberação de íons hidrogênio gerados pelo complexo ATP6i, que resulta em desmineralização (Li *et al.*, 1999). O processo lítico continua com a secreção de enzimas TRAP e pro-CATK na superfície escavada, chamada Lacuna de Howship (Boyle *et al.*, 2003). Os produtos da degradação do osso (fragmentos de colágeno, cálcio solubilizado e fosfato) são processados no interior dos osteoclastos e liberados na circulação sanguínea (Boyle *et al.*, 2003). Recentemente demonstrou-se a dinâmica das interações célula-célula durante a osteoclastogênese. Os osteoclastos maduros podem sofrer cisão, separando-se em células multinucleadas menores, porém ainda funcionais, e contínua fusão dessas células entre elas e com outras precursoras mononucleadas (Jansen *et al.*, 2012).

Esse processo de diferenciação de osteoclastos é controlado por pelo menos cinco vias de sinalização celular, mediadas por proteínas quinases, como quinase dos inibidores de NF- $\kappa$ B (IKK), quinase c-Jun N-terminal (JNK), p38, quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e pela tirosina quinase Src. O passo preliminar da sinalização de RANK é sua ligação ao fator citoplasmático associado a TNFR (TRAF)-6, que monta as proteínas de sinalização que direcionam a expressão gênica após a ligação de RANKL (Ye *et al.*, 2002).

A expressão de RANKL por osteoblastos e células do estroma ocorre sob estímulos pro-osteoclastogênicos diversos como 1,25(OH) $_2$  vitamina D $_3$ , hormônio paratireoidiano, PGE $_2$ , TNF, IL-6, IL-1, prolactina e corticoesteróides. O receptor “armadilha”, OPG, também é produzido por osteoblastos, células do estroma, endotélio

vascular e outras células em resposta a agentes anabólicos como estrógeno, TGF- $\beta$  e proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) (Boyle *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2006). Em 2007, Brechter & Lerner (2007) demonstraram que os efeitos sinérgicos da ativação dos receptores de cininas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  na produção de PGE<sub>2</sub> em osteoblastos envolvem o aumento de cicloxigenase-2, resultando na produção aumentada de RANKL pelos osteoblastos, por mecanismos dependentes de NF- $\kappa$ B e MAP quinases.

Outros tipos celulares, como linfócitos T e linfócitos B, expressam RANKL após serem ativados, sob estímulo de citocinas como IL-1, IL-6, IL-11, IL-17 e TNF- $\alpha$ , sugerindo que estados inflamatórios agudos e crônicos podem contribuir para perda óssea patológica (Kawai *et al.*, 2006). Além disso, há também evidências acerca dos mecanismos de supressão que desativam a via de sinalização de RANK após sua ativação em condições onde as células T estejam envolvidas. A degradação de TRAF6 após o início da sinalização de RANK estimulada por seu ligante é seletivamente aumentada, de forma acentuada, por IFN- $\gamma$  em cultura de células da medula óssea estimuladas por RANKL e M-CSF, resultando na inibição da formação de osteoclastos, mesmo na presença de quantidades excessivas de RANKL (Takayanagi *et al.*, 2000). Além disso, RANKL (mas não M-CSF) induz o aumento da expressão NOS e produção de NO, como *feed-back* negativo (Zheng *et al.* 2006). O NO também foi descrito como um regulador da reabsorção óssea induzido por citocina (Evans & Ralston, 1996), uma vez que IFN- $\gamma$  induz a produção de NO, o que suprime *in vitro* a formação de osteoclastos em um sistema de co-cultura de precursores de medula e osteoblastos pela indução de apoptose dos precursores (van't Hof & Ralston, 1997).

As pesquisas extensivas no campo da imunologia permitiram o refinamento das ideias a respeito da patogênese da doença periodontal, ampliando os horizontes conceituais para a imunidade adaptativa. A correlação positiva entre a doença e altos títulos de anticorpos no soro e fluido gengival sugeriu o envolvimento da resposta imune específica para diversas bactérias presentes na lesão (Lindhe & Rylander, 1975). Por serem também abundantes na lesão inicial, o papel das citocinas produzidas pelas células T *helper* (T<sub>h</sub>) era considerado dentro do paradigma T<sub>h</sub>1/T<sub>h</sub>2, o qual orientaria a

diferenciação de células B em plasmócitos produtores de anticorpos específicos, protetores ou não. Considerava-se que o equilíbrio entre a resposta inflamatória e os anticorpos protetores era regulado pelo conjunto de citocinas produzidas pelos macrófagos e células T.

A resposta T se inicia com o reconhecimento de patógenos por células apresentadoras de antígenos (APCs), como DCs, através de receptores *toll-like* (TLRs), por proteínas com domínio de ligação a nucleotídeos e oligomerização (NODs), entre outros. Após a ativação, as DCs maduras expressam moléculas co-estimulatórias e produzem padrões de citocinas distintos que determinarão a subsequente polarização e ativação de linfócitos T (Cutler & Jotwani, 2004). Classicamente, até o início dos anos 2000, as células T efectoras CD4<sup>+</sup> eram designadas T<sub>h</sub>1 ou T<sub>h</sub>2 baseando-se nos seus perfis de citocinas. O subtipo T<sub>h</sub>1 é definido pela produção de interferon (IFN)- $\gamma$ , quando as células T *naïves* eram expostas a antígenos apresentados por DCs na presença de IL-12. Esse processo é dependente do fator de transcrição STAT-4 e de T-bet. As células T<sub>h</sub>2 são identificadas através da produção de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 quando expostas à IL-4 durante sua ativação, dependente dos fatores de transcrição STAT-6, GATA-3 e c-maf. O desenvolvimento de um ou outro subtipo é mutuamente antagonístico e auto-estimulado (Gaffen & Hajishengallis, 2008).

Frequentemente T<sub>h</sub>1 era descrito como responsável por ativar fagócitos da imunidade inata e T<sub>h</sub>2 por estimular a produção de anticorpos no curso da periodontite (Page *et al.*, 1997). Sendo assim, aparentemente as citocinas T<sub>h</sub>1 seriam predominantes na lesão inicial, a partir da qual havia declínio seguido do aumento das citocinas T<sub>h</sub>2 nos estágios mais tardios da infecção (Gaffen & Hajishengallis, 2008; Garlet, 2010). Por vezes na literatura, o perfil T<sub>h</sub>1 era negativamente correlacionado com atividade de doença em humanos (Johnson & Serio, 2005), suportando, mesmo que de forma inconclusiva, a evidência de que a progressão da doença estaria relacionada à incompetência da resposta T<sub>h</sub>1. Por outro lado, foram encontradas por Berglundh *et al.* (2002) quantidades semelhantes de células que expressam citocinas T<sub>h</sub>1 e T<sub>h</sub>2 em lesões periodontais avançadas.

Apesar da sua atraente simplicidade, o paradigma  $T_h1/T_h2$ , cujo entendimento da época tornava-o maniqueísta, confundia os autores com os resultados. Assim, os dados disponíveis na época suportavam a hipótese de que tanto o subtipo  $T_h1$  quanto  $T_h2$  participariam no desenvolvimento da periodontite, sem a convicção de que um único subtipo estaria associado com uma condição clínica específica (Gemmel *et al.*, 1997). Nessa busca pelo promotor e pelo atenuador da doença creditou-se, portanto, maior importância ao tipo de citocina presente, sua concentração e sua atividade biológica, do que ao subtipo de célula T *helper* presente (Gemmel *et al.*, 1997).

De fato, tanto os danos teciduais causados no curso da doença periodontal como aqueles causados pelo sistema imune em diversas outras patologias tais como doenças autoimunes, incluindo artrite reumatóide e esclerose múltipla, não podiam ser completamente explicados dentro do paradigma  $T_h1/T_h2$  (Rosloniec *et al.*, 2002).

Utilizando modelos de encefalomielite experimental (EAE) e artrite induzida por colágeno tipo II, ambos considerados do tipo  $T_h1$ , verificou-se que as células T efectoras  $CD4^+$  produtoras de IL-17, e não de IFN- $\gamma$ , eram responsáveis pelos danos teciduais, fato que desafiou os conceitos clássicos de indução e manutenção dessa doença por células  $T_h1$  (Murphy *et al.*, 2003; Cua *et al.*, 2003; Langrish *et al.*, 2005). Nesses experimentos, em modelo murino, a ausência de IL-23 que induz o desenvolvimento de células efectoras produtoras de IL-17 promove atenuação da doença, enquanto a deficiência de IL-12, e consequentemente células efectoras produtoras de IFN- $\gamma$ , exacerba o desenvolvimento da doença. Posteriormente, Harrington *et al.* (2005) apresentaram evidências de que um subtipo de células T efectoras  $CD4^+$  produtoras de IL-17 ( $T_h17$ ) se diferencia por uma via que se distingue precocemente das linhagens  $T_h1$  e  $T_h2$ , e é antagonizado pelas citocinas características desses subtipos, IFN- $\gamma$  e IL-4 respectivamente. A diferenciação  $T_h17$  é dependente da presença de TGF- $\beta$ , IL-1, IL-6 e IL-21 via STAT-3, enquanto IL-23 é responsável pela expansão clonal e sobrevivência. Os fatores de transcrição que determinam a diferenciação  $T_h17$  são aqueles da família ROR (receptores nucleares órfãos), incluindo ROR $\gamma$ t e ROR $\alpha$  (Gaffen & Hajishengallis, 2008).

A regulação negativa, que atenua a resposta e permite a resolução do processo inflamatório, também ganhou reconhecimento dentro do entendimento das doenças, principalmente autoimunes. Nos anos 1970 Gershon *et al.* (1972) sugeriram a existência de um subtipo de células T com atividade supressiva. Mais de vinte anos depois, em 1995, Sakaguchi *et al.* descreveram em camundongos uma população de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naturais com funções regulatórias *in vivo* e *in vitro* (Sakaguchi *et al.*, 2011). No final dos anos 1990 as células T supressoras, então chamadas de células T regulatórias (T<sub>reg</sub>), foram descritas e caracterizadas *in vitro* (Takahashi *et al.*, 1998; Thornton & Shevach., 1998). As células T<sub>reg</sub> naturais atuam suprimindo a ativação de células T *naïves* via privação transiente de sinais como CD28 e IL-2 de células T, mantendo-as no estado *naïve* nos tecidos linfóides. Durante processos inflamatórios como infecções, as células T<sub>reg</sub> adquirem a capacidade de inativar ou induzir apoptose de células T efectoras e APCs via formação granzima/perforina e produção de IL-10, arrefecendo respostas imunes excessivas (Yamaguchi *et al.*, 2011). As células T<sub>reg</sub> naturais e T<sub>h</sub>17 foram identificadas em biópsias de tecido gengival de pacientes com doença periodontal e saudáveis, trazendo evidências da sua participação na patogênese da doença periodontal, embora sem elucidar seus mecanismos (Cardoso *et al.*, 2008; Cardoso *et al.*, 2009).

Em vista disso, o consenso do Seventh European Workshop on Periodontology (Kinane *et al.*, 2011) comentou as últimas publicações sobre os mecanismos de interação entre o hospedeiro e os microrganismos e revisou o quadro-resumo da patogênese da doença periodontal (Figura 1.7). Nesse debate, concluiu-se que a resposta do hospedeiro frente à microbiota na doença periodontal é altamente complexa e individual no tocante à variabilidade em todos os aspectos das respostas imunes.

Dentro desse contexto, a relação entre as cininas e a resposta imune adaptativa tem sido explorada na literatura. Existem evidências de que as cininas exógenas induzem a maturação de DCs através da estimulação do seu B<sub>2</sub>R. Os autores propuseram que as cininas podem funcionar como um “sinalizador de perigo”, que induz a polarização para a resposta protetora T<sub>h</sub>1 via IL-12 (Aliberti *et al.*, 2003). Nesse trabalho, os autores

utilizaram um modelo murino de alergia, mostrando que a injeção de emulsão de antígenos ovoalbumina (OVA) suplementada com BK desviou a resposta T específica para OVA, do tipo  $T_{h2}$  para o tipo  $T_{h1}$ , e preveniu a infiltração de eosinófilos na pleura dos camundongos desafiados. Além disso, esse trabalho demonstrou que as cininas estimulam as DCs a produzir IL-12 através da sinalização do receptor constitutivo  $B_2$  e que o pré-tratamento dos animais com capto ril (inibidor da ECA) aumentou a duração da resposta. Também foi observado *in vitro* o aumento da produção de IL-10 pelas DCs na presença do agonista do receptor  $B_2$ . O tratamento com inibidor de ECA gerou resultados semelhantes, sugerindo que, na ausência de agonista exógeno, as DCs produzem IL-10 em resposta a baixos níveis endógenos de cininas presentes na cultura.

Mais tarde, Monteiro *et al.* (2006) confirmaram o mecanismo sugerido por Aliberti *et al.* (2003) em modelo murino de infecção subcutânea de *Trypanosoma cruzi*, um protozoário capaz de liberar cininas a partir do cininogênio através de sua protease cruzipaina. A intensidade do edema na pata infectada pelos tripomastigotos dependente do  $B_2R$  estava correlacionado com os níveis de IL-12 produzidos pelas DCs isoladas dos linfonodos drenantes. Esse efeito estimulatório da resposta inata estava ligado ao aumento da produção de IFN- $\gamma$  dependente de  $B_2R$  por células T antígeno-específicas. A quantidade de IL-12 foi fortemente aumentada nos camundongos infectados tratados previamente com inibidores de ECA. Entretanto, os tripomastigotos não desencadearam resposta imune do tipo 1 em camundongos nocaute para TLR2 (TLR2<sup>-/-</sup>), mesmo após tratamento com inibidor da ECA. Aparentemente, o TLR2 é responsável pelo extravasamento de plasma e consequente acúmulo de cininogênio no sítio de infecção, contribuindo para a geração da resposta protetora  $T_{h1}$ . A resposta tipo 1 deficiente no animais TLR2<sup>-/-</sup> foi resgatada pela administração de cininas exógenas. Em suma, a liberação de cininas endógenas em sítios inflamatórios é capaz de modular positivamente a imunidade inata e adaptativa através de mecanismos que dependem de efeitos cooperativos entre TLR2,  $B_2R$  e ECA.

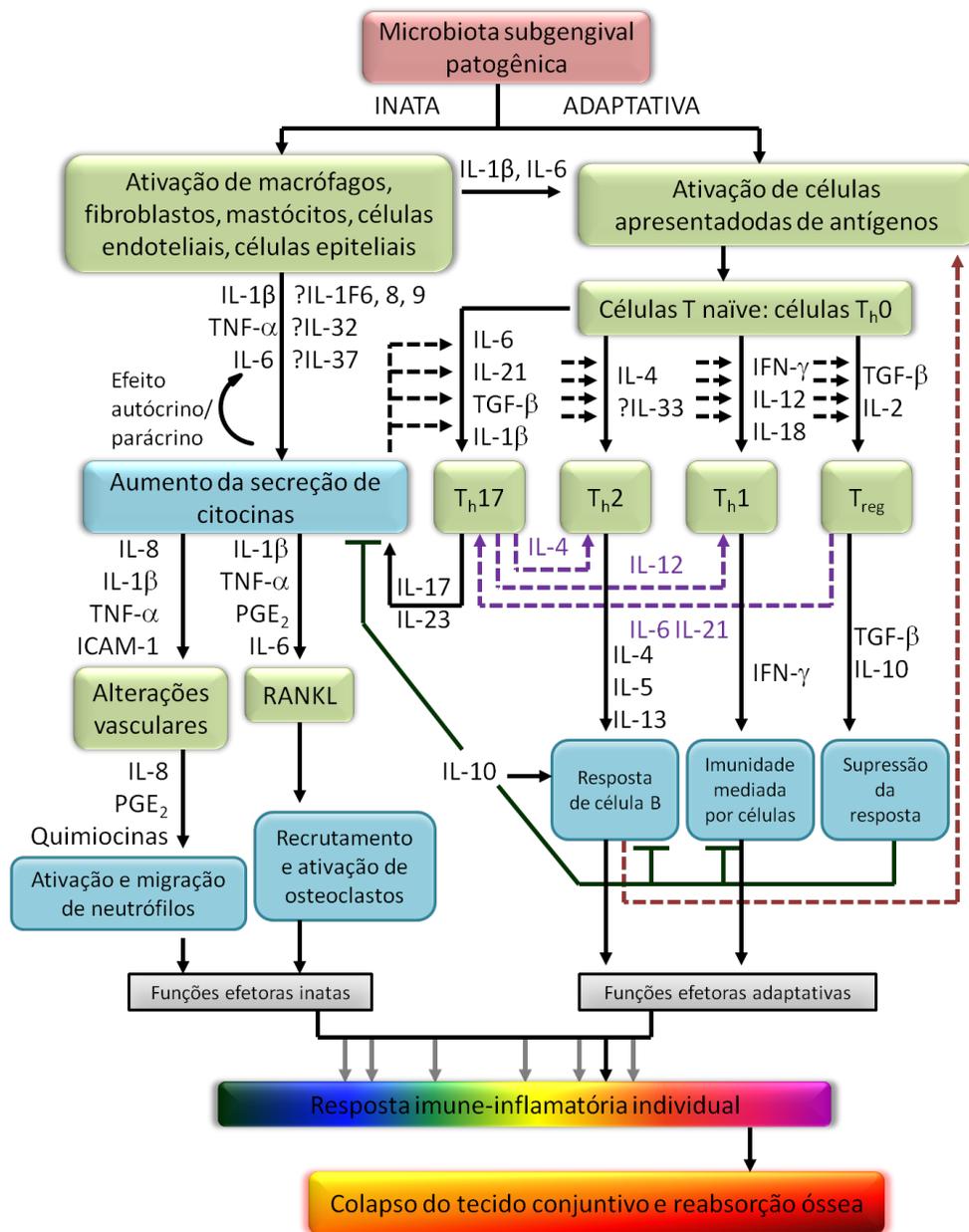


Figura 1.7 – Modelo atual de patogênese, demonstrando diversos fatores que contribuem para o desenvolvimento da periodontite, baseado nos processos e vias conhecidas até o presente momento. A resposta imune adaptativa é considerada nesse novo modelo de patogênese, ampliando as possibilidades de intervenção visando à modulação da resposta do hospedeiro.

Fonte: Modificado de Kinane *et al.*, 2011.

No ano seguinte, Monteiro *et al.* (2007) demonstraram que os animais nocaute para o receptor B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) infectados por *T. cruzi* pela via intraperitoneal ostentavam parasitemia e taxa de mortalidade elevadas em relação aos animais selvagens. Esse padrão susceptível é consequência de células dendríticas cuja capacidade de detectar as cininas estava comprometida, gerando colapso na resposta protetora T<sub>h</sub>1, associada ao aumento da produção de IL-17 pelos linfócitos T recuperados do baço e do coração dos animais infectados em estágios mais avançados da doença (após 28 dias). Entretanto, a transferência adotiva de DCs selvagens (que expressam o receptor B<sub>2</sub>) para camundongos B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> reverteu o fenótipo susceptível, restaurando o desenvolvimento da resposta T<sub>h</sub>1 e retraindo a produção de IL-17 tanto no baço quanto no coração dos camundongos receptores B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>.

Além do *T. cruzi*, outros patógenos são capazes de ativar o sistema calicreína-cininas. A bactéria *Porphyromonas gingivalis*, encontrada frequentemente em lesões periodontais, apresenta como fator de virulência cisteína-proteases denominadas gengipaínas, que são também capazes de ativar precalicreína e liberar cininas (Imamura *et al.*, 1994). Isso posto, Monteiro *et al.* (2009) verificaram o impacto da ativação do sistema calicreína-cininas no desenvolvimento de células T em camundongos desafiados por doses baixas de *P. gingivalis* inoculadas na mucosa alveolar. Foi demonstrado que a *P. gingivalis* selvagem, mas não a *P. gingivalis* mutante que não expressa gengipaína, suscita edema na mucosa alveolar em camundongos. O tratamento com inibidores de gengipaína resultou na mesma resistência ao edema, ratificando sua participação no processo. Utilizando modelos TLR2<sup>-/-</sup>, B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> e depleção de PMN nos animais selvagens, verificou-se que *P. gingivalis* induz edema na mucosa alveolar através da ativação sequencial de TLR2/PMN, sendo o extravasamento de plasma amplificado pela liberação de cininas vasoativas a partir do cininogênio plasmático dependente de gengipaína. Ademais, a ativação do eixo TLR2→PMN→B<sub>2</sub>R nos estágios iniciais da infecção impactou o desenvolvimento da resposta imune adaptativa. A análise do tipo *recall*, na qual o antígeno fimbria (Fim) é isolado para nova ativação das células T previamente ativadas durante a infecção, indicou que a gengipaína direciona a produção de INF-γ

(C57Bl/6 e Balb/c) e de IL-17 (Balb/c) dependente do receptor B<sub>2</sub> nos linfonodos submandibulares dos animais. Desse modo, os dois fatores de virulência, o LPS atípico ligante de TLR2 e gengipaina, moldam um “*cross-talk*” entre os receptores TLR2 e B<sub>2</sub>R formando um eixo inato que guia o desenvolvimento de células T Fim-específicas nos camundongos desafiados pela *P. gingivalis*.

O receptor B<sub>1</sub> foi apontado como importante modulador do tráfego de células do sistema imune no sistema nervoso central (SNC) no trabalho de Schulze-Topphoff *et al.* (2009). Os autores demonstraram que o agonista R838 (Sar-[D-Phe]des-Arg<sup>9</sup>-BK) reduz drasticamente os sintomas da EAE em camundongos SJL, enquanto a administração do antagonista de B<sub>1</sub>R, o peptídeo R715 (Ac-Lys-[D-βNal<sup>7</sup>,Ile<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK), resultou no desenvolvimento precoce e agravamento da doença. Nesse estudo, também o modelo genético corroborou o modelo farmacológico. Os camundongos nocaute para o receptor B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>) imunizados com fragmentos de glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (MOG<sub>35-55</sub>) mostraram doença mais severa com aumento do infiltrado de células do sistema imune no SNC. O mesmo ocorreu para os animais que sofreram transferência adotiva de células T B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>, os quais exibiram aumento da invasão celular de linfócitos T<sub>h</sub>17 no SNC. O ensaio de migração *in vitro* reforçou esse dado, quando a adição de R838 na cultura resultou na redução da migração de células T<sub>h</sub>17 de memória, mas não das células T<sub>h</sub>1, em direção ao gradiente de CXCL12. Nos camundongos selvagens, o desenvolvimento de linfócitos T<sub>h</sub>17 não sofreu influência da ativação do receptor B<sub>1</sub>. Entretanto, nos animais B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> a população de linfócitos IL-17<sup>+</sup> aumentou de forma significativa em relação aos animais selvagens durante o desenvolvimento da EAE, sem alterações significativas na proporção de células T produtoras de INF-γ ou células FoxP3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>.

Assim, diante do conjunto de evidências da influência do receptor B<sub>1</sub> no metabolismo ósseo e na modulação do sistema imune, e sendo a periodontite uma condição inflamatória que resulta em alterações no metabolismo ósseo, questionamos o papel do receptor B<sub>1</sub> no desenvolvimento da doença periodontal.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o papel do receptor B<sub>1</sub> de cininas na patogênese da doença periodontal experimental.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o papel do receptor B<sub>1</sub> na perda óssea periodontal e produção de citocinas pelas células de linfonodo submandibular;
- Avaliar o desenvolvimento e função de osteoclastos provenientes dos animais nocaute para o receptor B<sub>1</sub> de cininas.
- Avaliar o impacto da ativação ostensiva do receptor B<sub>1</sub> de cininas no desenvolvimento da PEx.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Para os experimentos, foram utilizados camundongos machos com doze semanas de vida, nocaute homocigotos para o receptor B<sub>1</sub> de cininas (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>). Foi feito o cruzamento de dez gerações com animais selvagens C57Bl/6 nas dependências do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia - CEDEME, Universidade Federal de São Paulo - Unifesp. Como controle de qualidade, a genotipagem dos animais foi feita através da coleta de tecido da cauda dos camundongos e obtenção de *pool* de DNA por caixa, do qual buscou-se nos animais nocaute a identificação do gene de resistência à neomicina (sequência de *primers*: 5'-CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC-3', 5'-AGG TGA GAT GAC AGG AGA AGA TC-3') e ausência do gene do B<sub>1</sub>R (sequência de primers: 5'-CCA GCA ACC TGT AGC GGT CC-3', 5'-CGG AAG CCT GGG ATC TGC TG-3'). Os animais selvagens (Wt) de mesma idade e gênero foram utilizados como controles em todos os experimentos. Também foram utilizados ratos Wistar machos com doze semanas de vida nos experimentos complementares.

Os animais foram mantidos sob temperatura controlada (21 a 23 °C), num ciclo de claro/escuro de 12/12 horas, com acesso livre a água e ração. Para anestesia, foram utilizados quetamina e xilasina na dose de 100 mg/kg e 20 mg/kg, respectivamente, diluídos 1:1 em solução salina, aplicados pela via intramuscular, na parte interna da coxa.

Os cuidados com os animais, bem como os procedimentos experimentais, foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unifesp (Protocolo 1796/06).

### 3.2 Periodontite experimental e medidas de perda óssea

Foram posicionadas ligaduras de algodão (Cotton Black, 4-0/45, non-needle; Brasuture, São Sebastião da Gramma, SP, Brasil) ao redor do primeiros molares inferiores esquerdos dos animais através do método adaptado da técnica original em ratos, de Johnson (1975). Após a anestesia, os animais eram posicionados no aparato de Doku produzido artesanalmente em nosso laboratório, com base na descrição de Johnson (1975), permitindo a abertura da boca e afastamento da língua para visualização do molar inferior. Com auxílio de um espaçador endodôntico digital número 10 (Injecta, São Bernardo do Campo, SP, Brasil) acoplado ao cabo de uma escova interdental (Oral B<sup>®</sup>, Cincinnati, OH, USA), o fio era delicadamente guiado até a distal do primeiro molar inferior, passando o ponto de contato. O dente era então envolvido pelo fio, posicionado subgingivalmente e fixado por um nó duplo feito na mesial. Durante a colocação da ligadura, todos cuidados eram despendidos para que não houvesse luxação do dente, permitindo o posicionamento atraumático do fio. Esse procedimento induz à colonização bacteriana e ao acúmulo de placa, além da irritação mecânica constante durante o período experimental (Figura 3.1). O molar contralateral que permaneceu sem ligadura foi utilizado para mensurar o espaço do ligamento periodontal e normalizar os dados das medidas de perda óssea.



Figura 3.1 – À esquerda, a fotografia demonstra o procedimento de colocação de ligadura, no qual um fio de algodão é posicionado em volta do primeiro molar inferior esquerdo, conforme apontado pela seta vermelha. À direita, a ligadura em posição, com o nó na mesial do dente.

Após 21 dias, os camundongos foram eutanasiados através do aprofundamento da anestesia. Em fluxo laminar, os linfonodos drenantes foram cuidadosamente removidos e mantidos em solução salina para posterior cultura celular e avaliação da secreção de citocinas. As mandíbulas foram então dissecadas, removidas e fixadas em solução tamponada de formalina 10% para análise histológica.

As amostras foram enviadas para processamento pela empresa privada Histotech (São Paulo, SP, Brasil), onde as peças foram incluídas em parafina, cortadas, montadas em lâminas histológicas e coradas com hematoxilina/eosina (H&E). As lâminas foram digitalizadas com uma câmera fotográfica acoplada ao microscópio de luz, utilizando-se o programa MetaVue Research Imaging Software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). A região de furca vestibular dos molares foi utilizada para a histometria das áreas de perda óssea e de ligamento periodontal, com auxílio do programa ImageJ 1.38X (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Foi feito o contorno das áreas a serem medidas, gerando polígonos cujo limite era o campo fotografado.

Desse modo, para cada animal, pelo menos três cortes foram medidos, com medidas repetidas três vezes cada. Os valores individuais foram obtidos por média aritmética. A perda óssea foi obtida através da traçado no programa de polígonos representativos das áreas de ligamento periodontal (do molar contralateral sem ligadura) da área de perda óssea na região de furca do molar submetido a PEx, cujo limite era o campo fotografado. A partir daí, a área total era obtida através da subtração da área do polígono representativo do ligamento periodontal da área do polígono representativo da região de perda óssea.

A unidade de medida para as lâminas obtidas de camundongos foi micrômetro quadrado ( $\mu\text{m}^2$ ) e para as lâminas obtidas de ratos foi milímetro quadrado ( $\text{mm}^2$ ), usando como referência a imagem digitalizada de uma câmara de Neubauer.

### **3.3 Produção de citocinas pelas células dos linfonodos submandibulares**

Para avaliar o papel dos linfócitos T no estabelecimento da PEx, as células dos linfonodos submandibulares de 10 camundongos por grupo foram cuidadosamente obtidas pela compressão dos linfonodos em tecido sintético de poliéster do tipo voil de 16 cm<sup>2</sup> esterilizado, imerso em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco<sup>®</sup>, Grand Island, NY, USA) contendo 5µM de β-mercaptoetanol (Calbiochem<sup>®</sup>, Billerica, MA, USA), 10% soro fetal bovino inativado por calor (Gibco<sup>®</sup>, Grand Island, NY, USA), 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma–Aldrich<sup>®</sup>, St Louis, MO, USA), com pH 7.2. As células passaram pelo filtro celular de 70 µm (BD Falcon<sup>™</sup>, San Jose, CA, USA), foram semeadas na densidade de 3 x 10<sup>5</sup> células/poço na presença ou não de 1µg/mL de anticorpo anti-camundongo CD3e (BD Pharmingen<sup>™</sup>, Mountain View, CA, USA) e incubadas por 72 h em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Os níveis de IL-17, IL-10, IFN-γ e TNF-α nos sobrenadantes das culturas foram determinados pelo ensaio imunoenzimático ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando pares de anticorpos anti-citocinas de *kits* comerciais (R&D Systems<sup>®</sup>, Minneapolis, MN, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. Esse método permitiu detecção de citocinas na faixa de concentração de 15-1000 pg/mL.

### **3.4 Tratamento com inibidor da ECA (iECA)**

Para corroborar os dados obtidos utilizando-se os animais nocaute para o receptor B<sub>1</sub> de cininas, ratos Wistar e camundongos C57Bl/6 foram submetidos a PEx conforme protocolo já descrito e tratados com o iECA maleato de enalapril diluído na água disponibilizada para os animais beberem. A dose conhecida para fins de controle de pressão arterial de 60 mg/L de água foi oferecida à vontade para os animais em bebedouros de vidro âmbar ou cobertos com plástico adesivo opaco para prevenir a fotodegradação do maleato de enalapril. Do mesmo modo, foi oferecida a outro grupo de animais uma dose cinco vezes inferior, de 12 mg/L e ao grupo controle foi oferecida apenas água. A água dos bebedouros, com medicação ou não, era mantida sob proteção da luz e trocada a cada dois dias.

A pressão sanguínea foi medida nos ratos conscientes previamente aquecidos em uma caixa com uma lâmpada incandescente, elevando a temperatura do ambiente para aproximadamente 30°C. Uma vez aquecidos, a pressão sanguínea era obtida através de pletismógrafo de cauda, usando um transdutor de pressão (PE-300, Barco Biosystem, Austin, TX, USA) conectado a um polígrafo (Gould Recorder, Cleveland, OH, USA), conforme descrito anteriormente por Santos *et al.* (2009). Cada animal foi submetido a três verificações da pressão, obtendo-se o valor individual por média aritmética.

Obtida a dose de maleato de enalapril que não altera a pressão sanguínea dos ratos, os camundongos foram submetidos a PEx e tratados com a dose ótima de iECA para posterior análise histométrica da região de furca do primeiro molar mandibular.

### **3.5 Cultura primária de osteoclastos**

#### **a. Enriquecimento da cultura de precursores de osteoclastos**

Os precursores de osteoclastos foram obtidos dos fêmures direito e esquerdo de camundongos  $B_1R^{-/-}$  e Wt através do lavado da cavidade medular com meio de cultura  $\alpha$ -MEM (Sigma, St Louis, MO, USA). Para a medição da frequência de células precursoras de osteoclastos, amostras de células foram coletadas e marcadas com anticorpo anti-camundongo CD11b conjugado com fluoresceína tiocianato (CD11b-FITC) (BD Pharmingen™, Mountain View, CA, USA) na concentração de 1:100 e com anticorpo anti-camundongo F4/80 conjugado com ficoeritrina (F4/80-PE) (BD Pharmingen™, Mountain View, CA, USA) na concentração de 1:100. Como controle da fluorescência não específica, algumas células foram incubadas na ausência de anticorpos. Todas as diluições foram feitas em PBS-BSA 1% e as ligações não específicas ao receptor Fc foram prevenidas pela incubação prévia com anticorpos anti-camundongo CD16/CD32, BD Fc Block (BD Pharmingen™, Mountain View, CA, USA) por pelo menos 15 minutos antes da marcação com anticorpos específicos. A aquisição foi feita no citômetro FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences™, San

Jose, CA, USA). Foram contados 10000 eventos e a frequência de cada marcador de superfície celular foi determinada utilizando o programa BD CellQuest Pro (BD Biosciences™, San Jose, CA, USA).

Com objetivo de enriquecimento da cultura, reduzindo a quantidade de células T e B, que são indesejadas por serem fontes de RANKL (Kawai *et al.*, 2006), foi feita a depleção dessas células por sua ligação à anticorpos adsorvidos a placas de Petri. Para isso, as células foram sequencialmente incubadas por 15 min em duas placas de Petri com anticorpos anti-camundongo IgG (BD Pharmingen™, Mountain View, CA, USA) adsorvidos (concentração final de 10 µg/mL) e duas placas de Petri com anticorpos anti-camundongo IgM (BD Pharmingen™, Mountain View, CA, USA) adsorvidos (concentração final de 10 µg/mL). Em seguida, as células foram diluídas em  $\alpha$ -MEM e submetidas a centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque 1077, densidade:1077g/mL (Sigma, St Louis, MO, USA) conforme instruções do fabricante, visando à obtenção de células mononucleares, removendo assim eritrócitos e granulócitos. Amostras de células de cada grupo foram coletadas após o protocolo de enriquecimento e avaliadas por citometria de fluxo, do mesmo modo já descrito para as células de medula total.

#### **b. Cultura de osteoclastos**

Após o enriquecimento,  $10^4$  células por poço foram incubadas em meio de cultura  $\alpha$ -MEM por 1 h para aderirem em placas de cultura celular de 96 poços, de fundo plano com tampa (Nuclon Delta surface, Nunc, Roskilde, Dinamarca), ou na placa forrada por fosfato de cálcio, BD BioCoat™ Osteologic™ 16-well Multitest Slides (BD Biosciences™, Bedford, MA, USA). As células aderentes foram então incubadas por 48 h em meio de cultura  $\alpha$ -MEM pH 7.2-7.4, suplementado com 10% soro fetal bovino inativado por calor (Gibco®, Grand Island, NY, USA), 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma–Aldrich®, St Louis, MO, USA) e 25 ng/mL de M-CSF (Sigma, St Louis, MO, USA) e então mantidas por mais sete dias na presença de 25 ng/mL de M-CSF e 50 ng/mL de RANKL (Sigma, St Louis, MO, USA). As trocas de meio de cultura

sucederam-se a cada 72 h. No dia 9, as células na placa de cultura convencional foram coradas utilizando o *kit* comercial Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) (Sigma, St Louis, MO, USA). As células com três ou mais núcleos foram consideradas multinucleadas (Mn). As células Mn-TRAP<sup>+</sup> foram contadas e a área celular foi determinada utilizando o programa ImageJ e tendo como referência a câmara de Neubauer. O DNA nuclear foi corado com Hoechst (Invitrogen™ Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) e o citoesqueleto de actina foi corado com faloidina-rodamina (Sigma, St Louis, MO, USA) diluído 1:500, para a contagem dos núcleos.

No dia 14, a capacidade de desmineralização das células foi avaliada *in vitro* na placa forrada de fosfato de cálcio. As células foram lavadas com água Milli-Q, e incubadas por cinco minutos em solução aquosa de 6% de NaOCl e 5,2% de NaCl. Foram feitos três ciclos de enxague vigoroso e aspiração. As placas eram examinadas ao microscópio de luz para assegurar que as células haviam sido completamente removidas, e em seguida as placas eram lavadas com água Milli-Q e coradas pela coloração de von Kossa, para permitir a visualização das lacunas de desmineralização (Pugliese *et al.*, 2012).

### **c. Expressão gênica de arginase-1 (ARG-1)**

Para avaliar a expressão gênica de ARG-1 nas células da medula óssea de animais B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> e Wt durante a osteoclastogênese, o RNA total dessas células foi isolado. No dia 0 e antes de cada troca de meio de cultura, as células foram homogeneizadas com o reagente TRizol (Invitrogen™ Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) e tratadas com DNase I (Invitrogen™ Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA), de acordo com os respectivos protocolos do fabricante. A transcrição reversa foi realizada utilizando RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Burlington, ON, Canada), de acordo com o protocolo do fabricante. Para a síntese de cDNA foram utilizados hexâmeros aleatórios submetidos a 25 °C/ 5 min, 42 °C/ 60 min e 70 °C/ 5 min. O cDNA resultante foi então utilizado para a reação em cadeia da polimerase em tempo real (*real time* PCR), através do sistema de amplificação SYBR-Green. Para detectar as

expressões gênicas de ARG-1 (5'- TGG GGA AAG CCA ATG AAG AG -3' e 5'- GGG AGT GTT GAT GTC AGT GT -3') e GAPDH (5'- GGGCTGCCCAGAACATCAT -3' e 5'- CCGTTCAGCTCTGGGATGAC -3') foram utilizadas 100 ng cDNA livre de DNA genômico, 1x, Maxima™ SYBR<sup>®</sup>Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, Burlington, ON, Canada), e 50 ng dos *primers*. As reações foram submetidas à termociclagem, seguindo o protocolo de 95 °C/ 5 min e 35 ciclos de 95 °C/ 20 s, 60 °C/ 20 s e 72 °C/ 40 s. Foi utilizado o parâmetro  $2^{-\Delta C_t}$  para expressar o valor arbitrário de expressão gênica relativa para cada amostra, tomando como controle endógeno GAPDH.

### 3.6 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão de experimentos representativos. Todos os experimentos apresentados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. Os testes estatísticos utilizados foram ANOVA e Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) ou test “t” de Student não pareado bicaudal ( $\alpha = 5\%$ ). A análise estatística da pressão sanguínea foi feita utilizando o test “t” de Student pareado ( $\alpha = 5\%$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Aumento da perda óssea e secreção de IL-17 nos animais $B_1R^{-/-}$ durante a PEx

A inflamação periodontal foi induzida pelo posicionamento de uma ligadura de algodão ao redor do primeiro molar inferior esquerdo de camundongos Wt e  $B_1R^{-/-}$ , com o objetivo de verificar se a ausência do receptor  $B_1$  modificaria o curso da PEx.

A análise histomorfométrica da área de furca revelou que a perda óssea nos animais  $B_1R^{-/-}$  foi maior que nos animais Wt após 21 dias (Figura 4.1). Nos animais Wt, a área de perda óssea foi de  $90 \pm 2 \mu\text{m}^2$  (n=5), enquanto nos camundongos  $B_1R^{-/-}$  a área de perda óssea foi de  $99 \pm 1 \mu\text{m}^2$  (n=5), sendo essa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,005$ ). Foi possível observar que, ao final do experimento, o fio de algodão estava coberto de matéria alba, o que nos indica que o método foi eficiente para promover acúmulo de placa bacteriana durante os 21 dias experimentais.

Para confirmar a ativação de linfócitos T pela placa bacteriana desenvolvida na ligadura durante os 21 dias, as células dos linfonodos submandibulares foram ativadas *ex vivo* com ou sem anticorpo anti-camundongo CD3 para posterior avaliação do sobrenadante por ELISA (Figura 4.2). A PEx induziu o aumento da produção de IL-17 tanto pelos animais Wt quanto pelos animais nocaute. Entretanto, a produção de IL-17 pelos animais  $B_1R^{-/-}$  foi estatisticamente superior, quando comparada aos animais Wt. Em contraste, a secreção de IL-10 no sobrenadante foi reduzida nos animais Wt após 21 dias experimentais, enquanto nos animais  $B_1R^{-/-}$  não foram observadas mudanças no padrão de secreção dessa citocina em resposta à PEx. Nos animais Wt a quantidade de IL-10 secretada foi menor que nos animais  $B_1R^{-/-}$ . Já a citocina TNF- $\alpha$  foi secretada em maior quantidade pelos animais Wt como consequência da PEx, que não afetou a secreção de TNF- $\alpha$  nos animais  $B_1R^{-/-}$ .

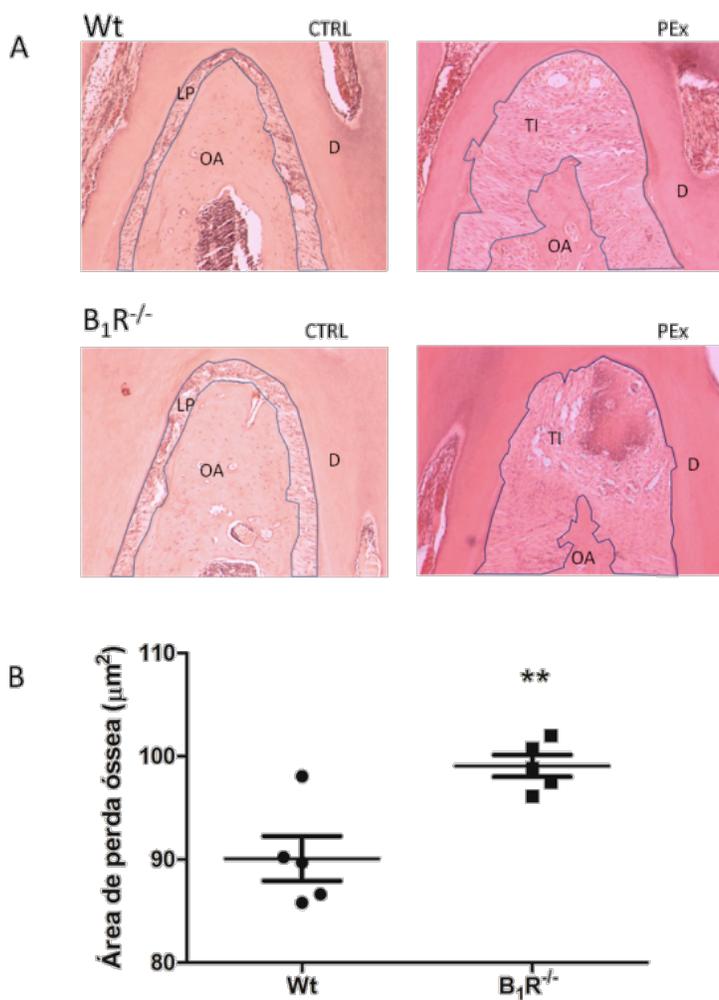


Figura 4.1 – Impacto da ausência do receptor B<sub>1</sub> na perda óssea alveolar experimental. (A) Imagens representativas de cortes histológicos da região de furca (coloração H&E, aumento original de 100X) indicando, nos grupos controle (CTRL), dentina radicular – D, espaço do ligamento periodontal – LP e osso alveolar – OA. Nos grupos PEx, que receberam a ligadura no primeiro molar inferior esquerdo, observa-se o espaço ocupado por tecido inflamatório (TI). (B) Área de perda óssea expressa em  $\mu\text{m}^2$ . Os valores apresentados são de um experimento representativo com cinco camundongos por grupo. A estatística foi feita através do test “t” de Student (\*\* $p < 0,005$ ).

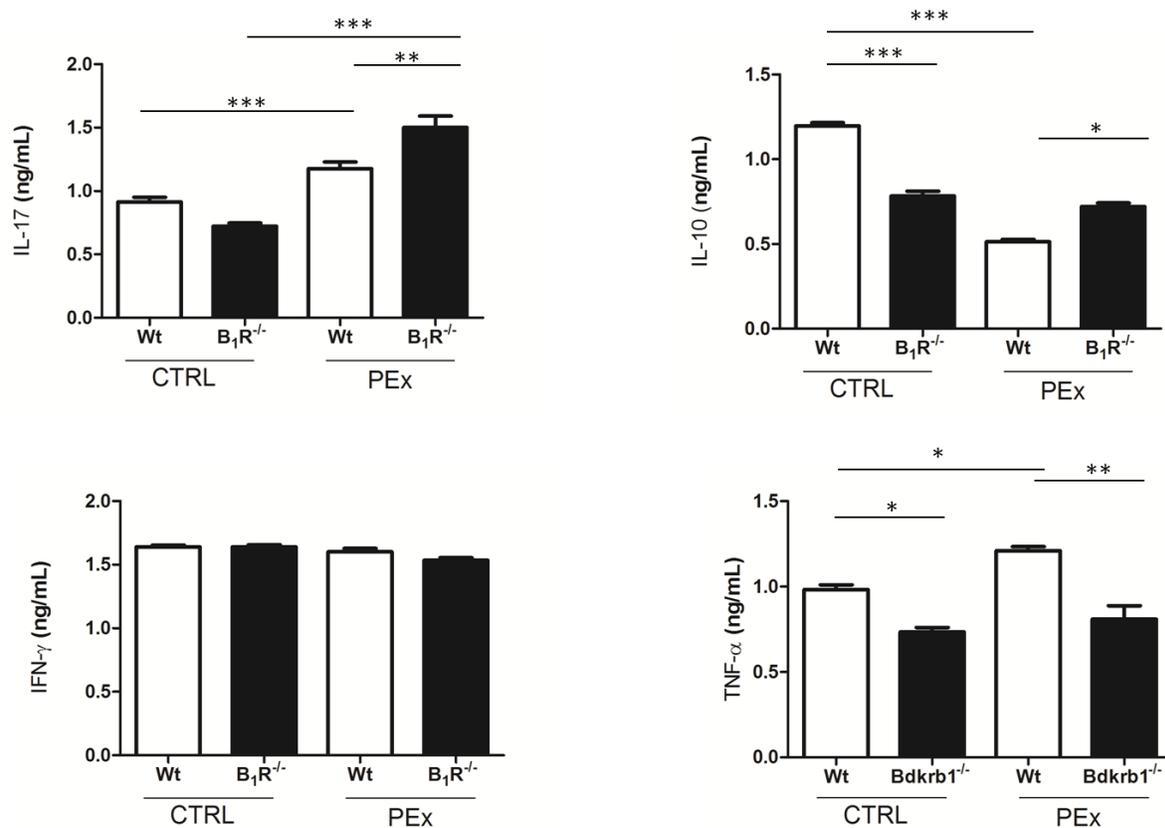


Figura 4.2 – Perfil de citocinas (concentração de IL-17, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) determinado por ELISA. As células provenientes dos linfonodos submandibulares dos animais selvagens (Wt) e nocaute para o receptor B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>) foram estimuladas com anticorpo anti-camundongo CD3 e após 72 h os sobrenadantes foram obtidos para determinar os níveis de citocinas. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão de 10 animais por grupo. As estatísticas foram realizadas por ANOVA e as comparações entre os grupos foram feitas através do teste Tukey (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ).

É interessante observar que, nos animais  $B_1R^{-/-}$ , nos quais não foi induzida a PEx, as quantidades de IL-10 e de TNF- $\alpha$  secretadas estavam estatisticamente mais baixas. Não houve qualquer alteração na concentração da citocina IFN- $\gamma$  no sobrenadante em resposta à PEx ou à deleção do receptor  $B_1$  de cininas. Outro dado interessante que é possível observar nesse experimento é que, mesmo na ausência de ligadura, quantidades consideráveis de citocinas são produzidas *ex vivo* após a ativação das células dos linfonodos submandibulares com anticorpo anti-camundongo CD3, o que denota que a placa bacteriana naturalmente presente nos dentes dos camundongos, ainda que em baixa quantidade, induz resposta T.

Na ausência de anticorpo, a quantidade de citocinas produzidas foi baixa, fora da faixa de sensibilidade do teste.

#### **4.2 Os osteoclastos provenientes dos animais $B_1R^{-/-}$ são mais numerosos**

Após demonstrar nos animais  $B_1R^{-/-}$  o aumento da perda óssea e o impacto dessa deleção genética no desenvolvimento da imunidade adaptativa em resposta ao acúmulo de placa experimental, investigamos o efeito autônomo da ausência do receptor  $B_1$  nos osteoclastos. Para isso, as células da medula óssea dos animais  $B_1R^{-/-}$  e Wt foram diferenciadas em osteoclastos utilizando protocolo de enriquecimento e posterior cultura na presença de M-CSF e RANKL.

O protocolo de enriquecimento permitiu o aumento da frequência de células  $CD11b^+$  provenientes de Wt e  $B_1R^{-/-}$ , de 31,78% e 36,83% para 68,00% e 70,63%, respectivamente (Figura 4.3).

Ao final da diferenciação *in vitro*, as células dos animais  $B_1R^{-/-}$  apresentaram-se maiores e mais numerosas, com maior número de núcleos quando comparadas aos animais Wt (Figura 4.4). Como essas células de tamanho significativamente maior poderiam apresentar distúrbios funcionais, foi feito o ensaio *in vitro* de desmineralização de fosfato de cálcio. Tanto as células Wt como as células  $B_1R^{-/-}$  mostraram-se

funcionalmente ativas, entretanto nas células  $B_1R^{-/-}$  a formação de lacunas de desmineralização foi mais pronunciada quando comparada à das células Wt (Figura 4.5), de modo a corroborar o aumento do número de osteoclastos observados na cultura de células  $B_1R^{-/-}$ .

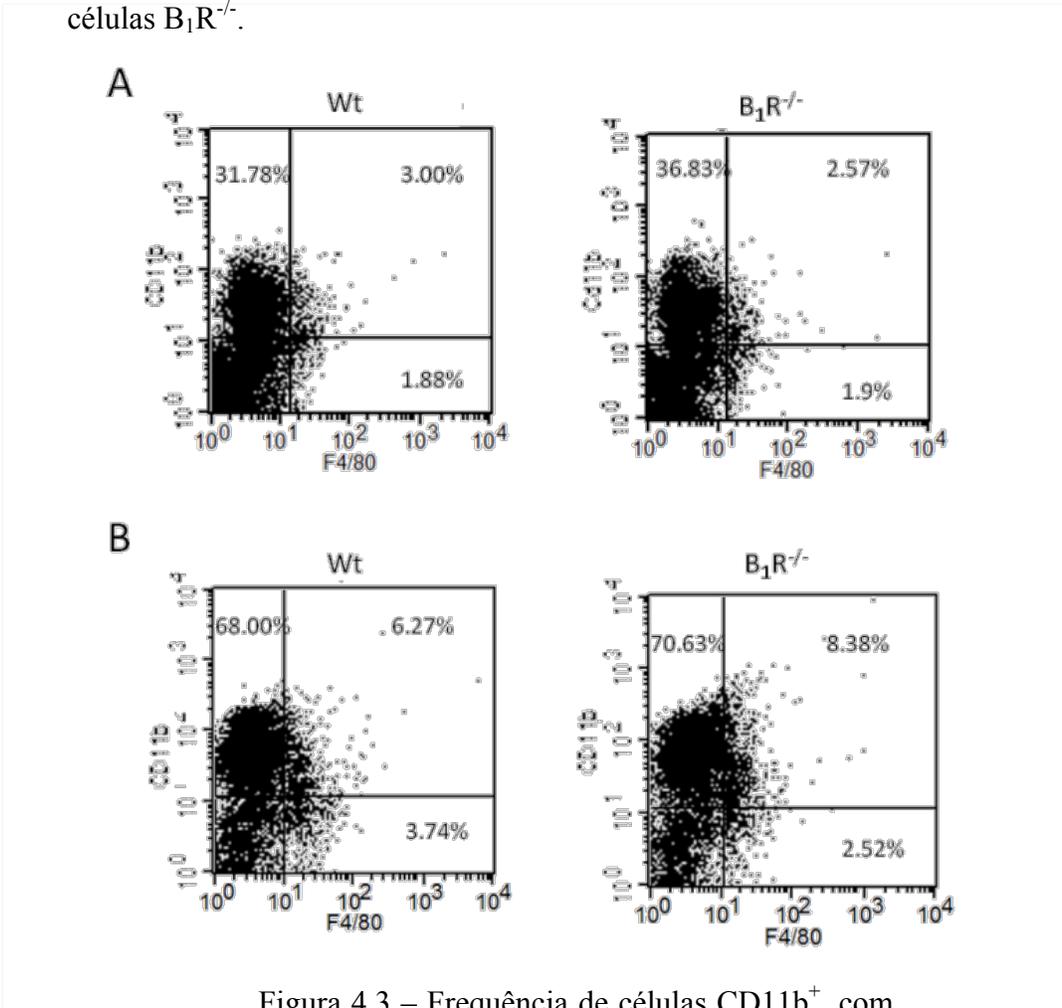


Figura 4.3 – Frequência de células  $CD11b^+$ , com potencial osteoclastogênico, após o protocolo de enriquecimento. (A) Gráficos representativos do percentual de células  $CD11b^+$  e  $F4/80^+$ , provenientes da medula óssea de animais selvagens (Wt) e nocaute para o receptor  $B_1$  ( $B_1R^{-/-}$ ). (B) Gráficos representativos do percentual de células  $CD11b^+$  e  $F4/80^+$ , provenientes da medula óssea de animais Wt e  $B_1R^{-/-}$  após o protocolo de enriquecimento. Os gráficos são representativos de dois experimentos com resultados semelhantes.



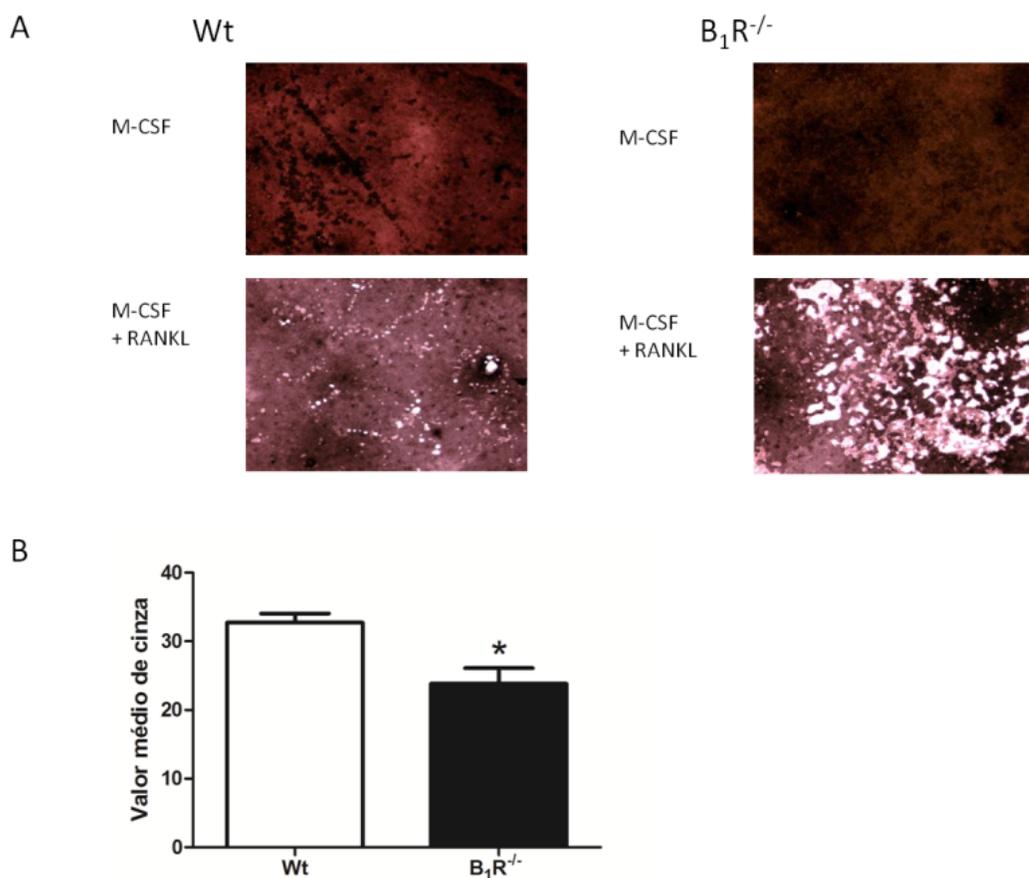


Figura 4.5 – Ensaio de desmineralização. (A) Fotomicrografia representativa da placa BD BioCoat™ Osteologic™ 16-well Multitest Slides após o décimo quarto dia de cultura sob as condições: M-CSF (25 ng/mL) ou M-CSF (25 ng/mL) e RANKL (50 ng/mL) (coloração Von Kossa, aumento original de 100x). (B) Valor médio de cinza no programa ImageJ, que corresponde ao valor inverso da formação de picos de desmineralização resultantes da atividade celular de precursores de osteoclastos diferenciados *in vitro*, provenientes tanto dos animais selvagens (Wt) como dos nocaute para o receptor  $B_1$  ( $B_1R^{-/-}$ ), sob as mesmas condições de cultura. As estatísticas foram realizadas através do test “t” de Student (\* $p < 0,01$ ).

### 4.3 Aumento da expressão de mRNA de ARG-1

Uma vez que o óxido nítrico é um importante modulador da osteoclastogênese (Zheng *et al.* 2006) e pode ser regulado pela arginase através da competição pela L-arginina intracelular (Chang *et al.*, 1998), a expressão de arginase-1 (ARG-1) foi avaliada durante a diferenciação de osteoclastos (Figura 4.6). Após a adição de M-CSF na cultura de células Wt, os níveis de mRNA de ARG-1 aumentaram 58 vezes, demonstrando que o M-CSF é um potente indutor da ARG-1 nos estágios iniciais da osteoclastogênese. Nos animais  $B_1R^{-/-}$  esse efeito foi dramaticamente aumentado, 255 vezes. A adição de RANKL na cultura, entretanto, reduziu os níveis de mRNA de ARG-1 retornando ao basal. Esse resultado sugere que o  $B_1R$  participa da resposta das células precursoras de osteoclastos ao M-CSF, visto que sua ausência implica no aumento da expressão de ARG-1 e possivelmente no aumento do consumo de L-arginina, reduzindo a disponibilidade de NO durante a osteoclastogênese.

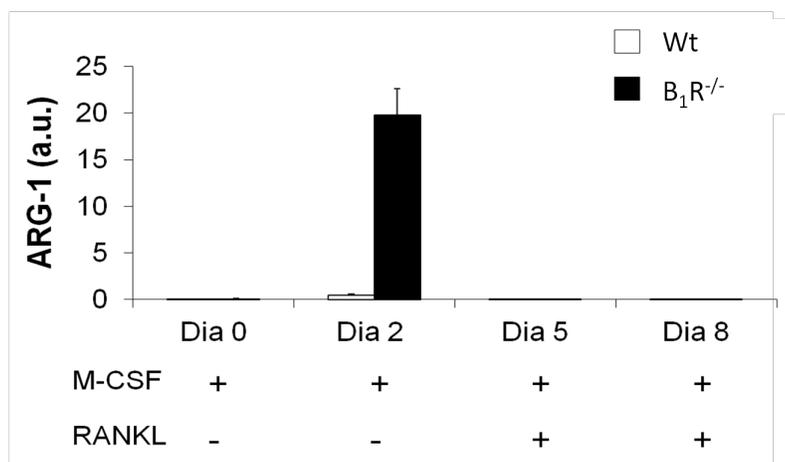


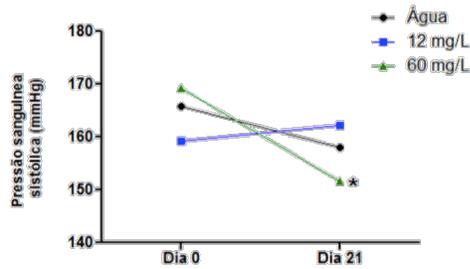
Figura 4.5 – A expressão do mRNA de ARG-1 foi quantificada usando PCR em tempo real, durante a osteoclastogênese a partir de precursores de medula óssea de animais Wt e  $B_1R^{-/-}$ . Os dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão do parâmetro  $2^{-\Delta Ct}$ , o que representa a unidade arbitrária (a.u.) relativa a expressão do mRNA de ARG-1 em relação ao mRNA de GAPDH.

#### **4.4 Redução da perda óssea induzida pela PEx após tratamento com maleato de enalapril**

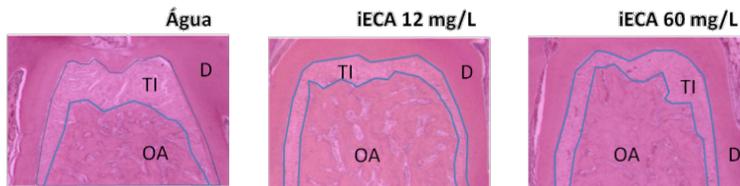
Na intenção de corroborar os dados obtidos com o modelo nocaute, o maleato de enalapril, um inibidor de ECA, foi administrado a roedores (ratos e camundongos) via oral, na água disponibilizada aos animais. Sob essa condição, a disponibilidade de cininas endógenas *in vivo* é aumentada pela redução da sua degradação resultante da prevenção da ação enzimática da ECA (Molinaro *et al.*, 2002). Entretanto, a hipotensão é um efeito da administração de iECA, indesejado nesse experimento, que denota a inibição do sistema renina-angiotensina. Assim, para dissociar o efeito direto do enalapril na inibição da perda óssea do seu efeito na alteração da pressão sanguínea, ratos foram submetidos a PEx e tratados com dose anti-hipertensiva de maleato de enalapril 60 mg/L de água (Santos *et al.*, 2008) ou uma dose cinco vezes reduzida (maleato de enalapril 12 mg/L de água).

A pressão sanguínea dos ratos foi obtida no dia 0 e após 21 dias. Como não foi feita prévia adaptação ao procedimento, a pressão arterial dos ratos estava alta no dia 0, provavelmente em decorrência do desconforto inerente à manipulação dos animais. Naqueles ratos que não receberam medicamento, a pressão arterial se manteve semelhante à basal após os 21 dias. Conforme esperado, o enalapril reduziu a pressão arterial dos animais que receberam a dose anti-hipertensiva, enquanto a dose mais baixa não alterou a pressão sanguínea dos ratos (Figura 4.7 A). Entretanto, o tratamento com iECA reduziu significativamente a perda óssea induzida pela PEx, independente da dose administrada (Figuras 4.7 B e C). Uma vez obtida a dose ótima de maleato de enalapril (a qual não altera a pressão arterial, mas previne a perda óssea induzida pela PEx), os camundongos Wt (C57Bl/6) foram tratados com maleato de enalapril (12 mg/L). Corroborando as observações pertinentes ao modelo nocaute, o maleato de enalapril resultou na redução da perda óssea experimental em camundongo após 21 dias de PEx (Figura 4.8), reiterando o papel das cininas na patogênese da periodontite experimental.

A



B



C

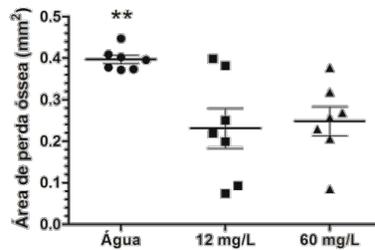


Figura 4.7 – Impacto do tratamento com maleato de enalapril no curso da PEx. (A) Pressão sanguínea sistólica de ratos no dia 0 e após 21 dias de tratamento com ou sem maleato de enalapril (iECA). Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão de sete ratos/grupo. A estatística foi realizada através do test “t” pareado ( $*p < 0,05$ ). (B) Fotomicrografias representativas da região de furca dos grupos de ratos Wistar que receberam água, iECA (12mg/L) e iECA (60 mg/L) para obtenção da área de perda óssea (coloração H&E, aumento original de 20X), indicando dentina radicular – D; osso alveolar – OA e tecido inflamatório – TI. (C) Área de perda óssea expressa em  $\text{mm}^2$ . Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão de sete ratos/grupo. As análises estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA e as comparações entre os grupos foram feitas através do teste Tukey ( $**p < 0,04$ )

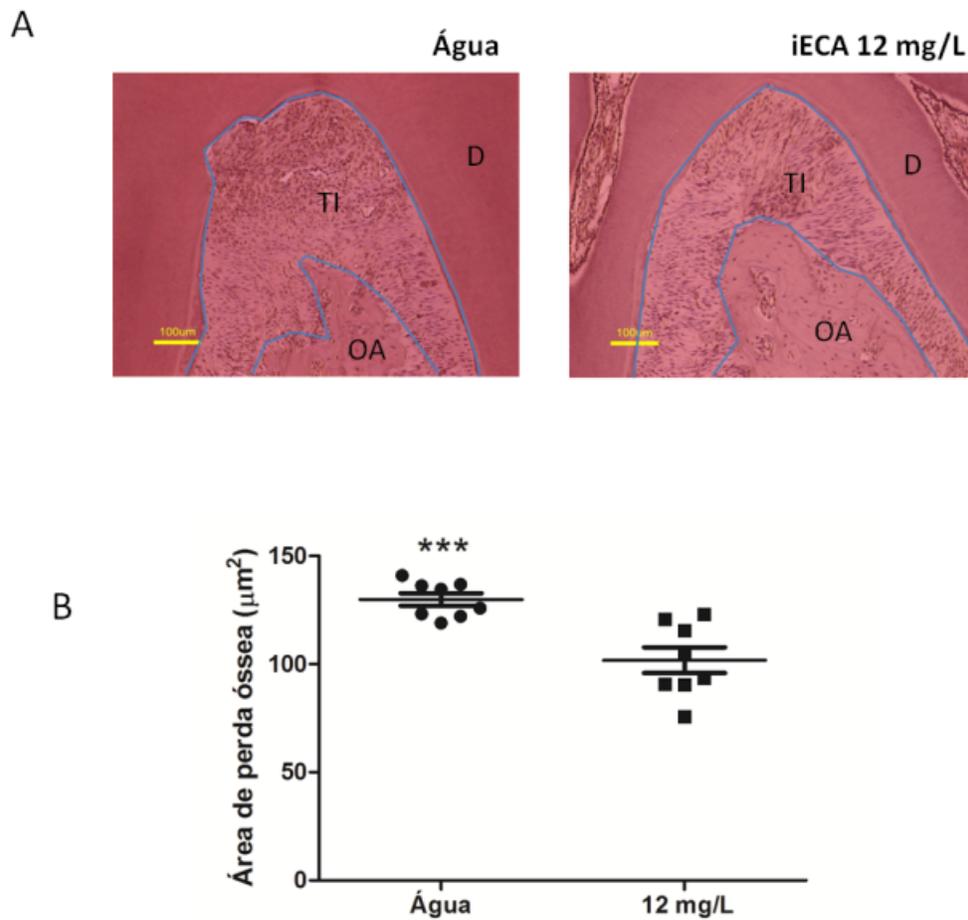


Figura 4.8 – Impacto do tratamento com maleato de enalapril no curso da PEx. (A) Fotomicrografias representativas da região de furca dos grupos de camundongos C57Bl/6 que receberam água ou iECA (12mg/L) para obtenção da área de perda óssea (coloração H&E, aumento original de 100X), indicando dentina radicular – D; osso alveolar – OA e tecido inflamatório – TI. (B) Área de perda óssea expressa em  $\mu\text{m}^2$ . Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão de oito camundongos/grupo. As análises estatísticas foram realizadas através do teste “t” de Student ( $***p < 0,001$ ).

## 5 DISCUSSÃO

Em sistemas *in vitro* e *ex vivo* tem sido demonstrado que a ativação dos receptores de cininas, B<sub>1</sub>R e B<sub>2</sub>R, resulta no aumento da biossíntese de prostaglandina induzida pela ação de citocinas como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , resultando no aumento da expressão de RANKL (Schenkein, 2006; Brechter & Lerner, 2007). Esses dados indicam que possivelmente o sistema caliceína-cininas interfere de algum modo na patogênese da doença periodontal. No presente trabalho, com o modelo de ligadura foram utilizadas estratégias *in vivo* e *ex vivo* que consideram a complexa rede envolvendo a participação de diversos sistemas no curso da doença periodontal experimental. Desse modo não foram isoladas a resposta imune inata da resposta imune adaptativa, além de permitir a participação dos tecidos periodontais vizinhos que possivelmente afetam o metabolismo ósseo alveolar no processo de desenvolvimento da doença. Tendo como base estudos *in vitro*, uma das hipóteses inicialmente levantadas foi que a ausência dos receptores de cininas ou seu bloqueio farmacológico trariam um efeito protetor contra a periodontite, o que resultaria da redução de mediadores pró-inflamatórios e moléculas pró-osteoclastogênicas. Entretanto, diferentemente do que se esperava, foi demonstrado aqui o aumento da perda óssea na ausência do receptor B<sub>1</sub>. Consistentes com esse dados, relatos recentes tendem a caracterizar o sistema caliceína-cininas como um sistema complexo, que pode desempenhar funções pro ou anti-inflamatórias, dependendo da doença e do sítio onde a mesma se desenvolve. Os experimentos realizados por Monteiro *et al.* (2007) revelaram o aumento da expressão de IL-17 e redução da expressão de IFN- $\gamma$  em esplenócitos de camundongos B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> após infecção por *T. cruzi*, sugerindo o papel protetor do B<sub>2</sub>R nesse modelo. Outro dado interessante, que corrobora os dados apresentados aqui, vem do trabalho de Schulze-Toppoff (2009) no qual a administração do agonista do receptor B<sub>1</sub> resultou na atenuação da progressão da encefalomielite experimental (EAE). Além disso, a deleção genética ou o bloqueio farmacológico do receptor B<sub>1</sub> resultou no desenvolvimento

precoce da EAE, que apresentou sintomas clínicos mais severos nos camundongos com desenvolvimento de resposta  $T_H17$  mais pronunciado. Juntos, esses dados referidos destacam a importância do receptor  $B_1$  na modulação da resposta imune e seu papel protetor nas duas condições. É interessante notar que no modelo de EAE a população de células  $T_H17$  estava aumentada nos animais  $B_1R^{-/-}$ , ao passo que não foram observadas diferenças na frequência de células produtoras de  $IFN-\gamma$  ou de células  $FoxP3^+ CD25^+$  (Schulze-Topphoff *et al.*, 2009). De modo semelhante, no presente trabalho foi demonstrado que a ausência do receptor  $B_1$  resulta no aumento da secreção de IL-17 por células do linfonodo submandibular após 21 dias de PEx, sem alterações na concentração de  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$  e IL-10. É importante ressaltar que a periodontite experimental em camundongos não alterou a secreção de  $IFN-\gamma$  por células do linfonodo, a despeito dos dados que sugerem sua importância no metabolismo ósseo. Por outro lado, a secreção de IL-10 parece parcialmente inibida, enquanto a secreção de  $TNF-\alpha$  parece estimulada pela PEx nos animais Wt, o que está de acordo com a literatura (Kinane *et al.*, 2011). A perda óssea pronunciada nos animais  $B_1R^{-/-}$  não pode ser relacionada ao aumento de  $TNF-\alpha$ , nem à redução de IL-10, uma vez que os níveis fisiológicos dessas citocinas estavam baixos nos animais nocaute e não foram modificados pela PEx. Assim, parece claro que a citocina IL-17 está envolvida na patogênese da periodontite no modelo experimental de indução de doença pela ligadura de algodão.

O trabalho aqui apresentado foi pioneiro na investigação da resposta T ao modelo de perda óssea alveolar induzida por ligadura, demonstrando o envolvimento da citocina IL-17 na periodontite experimental. Aparentemente, a IL-17 é capaz de estimular a produção de RANKL por osteoblastos e linfócitos T, regulando também o eixo RANK/RANKL/OPG na artrite reumatoide (Daoussis *et al.* 2010). Além disso, as células  $T_H17$  são fontes primárias de RANKL (Sato *et al.* 2006). Assim, pode-se sugerir que o receptor  $B_1$  desempenha papel modulador do desenvolvimento de células T, participando da patogênese da periodontite experimental através do estímulo osteoclastogênico da citocina IL-17.

Nosso trabalho também foi o primeiro a relatar o envolvimento direto do sistema caliceína-cininas na osteoclastogênese. Entretanto, não compreendemos os mecanismos através dos quais a deleção do receptor B<sub>1</sub> resulta no aumento da osteoclastogênese *in vitro*. Possivelmente, a redução do sinal inibitório do óxido nítrico está envolvido nesse processo. O NO é produzido pela oxidação do nitrogênio terminal do grupamento guanidino da L-arginina por uma das isoformas das enzimas da família das NO sintases (NOS). O NO é descrito como um sinal autócrino que limita a osteoclastogênese, por *feedback* negativo, estimulado por RANKL (van't Hof & Ralston, 1997; Zheng *et al.*, 2006). Foi demonstrado aqui que o mRNA de ARG-1 é fortemente aumentado, de maneira precoce, nos osteoclastos B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>. A adição de RANKL na cultura reduziu a expressão de mRNA de ARG-1. O aumento da expressão de ARG-1 pode resultar no aumento do consumo da L-arginina e conseqüentemente diminuição da disponibilidade de NO, reduzindo o *feed-back* negativo mediado pelo NO. Em um trabalho anterior, realizado em nosso laboratório, a deleção do receptor B<sub>1</sub> resultou na redução de biodisponibilidade de NO na arteríola mesentérica, acompanhada pelo aumento surpreendente da atividade de NOS (Loiola *et al.*, 2011). Outrossim, o NO é um conhecido supressor da proliferação e função de células T<sub>h</sub>17 humanas e murinas (Niebdala *et al.*, 2011). Assim, a pesquisa do metabolismo do NO em osteoclastos B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> pode responder se de fato o aumento do número de osteoclastos nos animais nocaute está relacionado à redução do *feedback* negativo pela redução da produção de NO.

Somado ao efeito autônomo da ausência do receptor B<sub>1</sub> nas células precursoras de osteoclastos, é possível que o aumento da osteoclastogênese nos camundongos B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> esteja associado ao aumento da secreção de IL-17 por linfócitos T, o que contribui para o aumento da perda óssea na periodontite experimental. Além disso, os experimentos apresentados aqui com células dos linfonodos submandibulares não demonstram alterações na secreção de IFN- $\gamma$ , um potente indutor de NO.

No presente estudo foi feita a confirmação farmacológica indireta do papel do sistema caliceína-cininas na periodontite experimental. Inicialmente, procedemos à injeção do agonista do B<sub>1</sub>R nos animais Wt, porém esse método requer punção diária e

introdução intraperitoneal da solução contendo o agonista, o que foi feito. Os animais desenvolveram peritonite e consequente ativação de linfócitos T, o que confundiu a análise do padrão de citocinas secretadas pelas células provenientes dos linfonodos submandibulares, que apresentaram altas concentrações de citocinas em todos os grupos, inclusive nos Wt sem ligadura. Desse modo, foi testado o efeito do iECA em camundongos com objetivo de aumentar a disponibilidade de cininas e seus efeitos no sistema proposto (PEx). O maleato de enalapril, um inibidor de ECA, foi administrado via oral de modo a eliminar a necessidade de punção e consequente inflamação em outro sítio que não o periodontal. Como a ECA é um componente comum aos sistemas caliceína-cininas e renina-angiotensina, fez-se necessário o ajuste da dose para que a mesma não resultasse em hipotensão. Em ratos, o maleato de enalapril na dose de 60 mg/L de água reduziu a perda óssea e simultaneamente resultou em hipotensão, ao passo que a dose de 12 mg/L preveniu a perda óssea sem alterar a pressão sanguínea dos ratos. Esse resultado confirma a importância das cininas para o desenvolvimento apropriado da resposta inflamatória frente ao acúmulo de placa induzido na PEx. Essa é, portanto, a primeira evidência do papel do sistema caliceína-cininas na homeostasia do periodonto.

Assim, parece verdade que o B<sub>1</sub>R contribui para a modulação da resposta inflamatória e produção de citocinas *ex vivo* por células dos linfonodos no modelo de ligadura e também para a modulação da osteoclastogênese *in vitro*, efeitos que podem se somar durante o desenvolvimento da PEx (Figura 5.1). Adicionalmente, foi possível demonstrar que a droga usualmente indicada para tratamento da hipertensão arterial, o iECA maleato de enalapril, pode também ser utilizado para reduzir a perda óssea experimental. Portanto, os dados apresentados demonstram a importância da ativação do receptor B<sub>1</sub> na patogênese da periodontite e nos permite sugerir estudos que visem ao uso de inibidores da ECA como adjuvantes do tratamento clínico da doença periodontal.

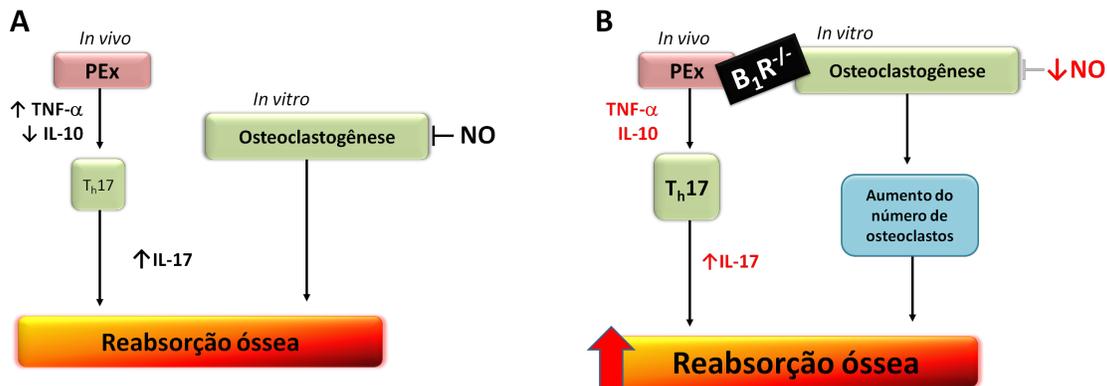


Figura 5.1 – Quadros-resumo descritivos do modo como os dados encontrados no presente trabalho afetam o curso da periodontite. Em (A) Citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-10 indiretamente contribuem para a montagem da resposta imune adaptativa. A PEx resulta no aumento da secreção de IL-17 e culmina com a perda óssea alveolar. *In vitro*, a osteoclastogênese induzida por M-CSF e RANKL é possivelmente inibida por *feed-back* negativo pela presença de NO. Em (B), a representação do modo como a ausência do B<sub>1</sub>R afetaria o curso da periodontite. No animal nocaute, a PEx não modificou os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-10, já reduzidos em relação aos animais Wt, possivelmente interferindo na montagem da resposta imune adaptativa, exacerbando a resposta Th17. Paralelamente, é provável que a redução da disponibilidade de NO reduza o *feed-back* negativo da ativação de osteoclastos pelo RANKL, resultando em aumento do número de células. Juntos, os dois mecanismos podem contribuir para o aumento da perda óssea na ausência do receptor B<sub>1</sub>.

## 6 CONCLUSÕES

O receptor B<sub>1</sub> de cininas é importante elemento da patogênese da doença periodontal experimental, pois:

1. A deleção genética do B<sub>1</sub>R em camundongos resultou no aumento da perda óssea periodontal em resposta a periodontite induzida por ligadura, relacionada ao aumento da produção de IL-17 pelas células de linfonodo submandibular;
2. A deleção genética do B<sub>1</sub>R resultou no aumento do número de osteoclastos provenientes de precursores da medula óssea e, conseqüentemente, maior degradação de matriz mineral; e
3. A administração via oral de inibidor de enzima conversora de angiotensina, maleato de enalapril, reduz a perda óssea durante o desenvolvimento da periodontite experimental.

## REFERÊNCIAS

Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(11): 5721-5732.

Aliberti J, Viola JP, Vieira-de-Abreu A, Bozza PT, Sher A, Scharfstein J. Cutting edge: bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells: a danger signal that drives Th1 polarization. *J Immunol.* 2003; 170(11): 5349-5353.

Allogho SN, Gobeil F, Pheng LH, Nguyen-Le XK, Neugebauer W, Regoli D, Kinin B1 and B2 receptors in the mouse. *Can J Physiol Pharmacol.* 1995; 73(12): 1759-1764.

Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME *et al.* A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature.* 1997; 390(6656): 175-179.

Araújo RC, Kettritz R, Fichtner I, Paiva AC, Pesquero JB, Bader M. Altered neutrophil homeostasis in kinin B1 receptor-deficient mice. *Biol Chem.* 2001; 382(1): 91-95.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999; 4(1): 1-6.

Armitage GC; Research, Science and Therapy Committee of The American Academy of Periodontology. Position Paper: Diagnosis of periodontal diseases. *J Periodontol.* 2003; 74(8): 1237-1247.

Berglundh T, Liljenberg B, Lindhe J. Some cytokine profiles of T-helper cells in lesions of advanced periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2002; 29(8): 705-709.

Bosshardt DD, Lang NP. The junctional epithelium: from health to disease. *J Dent Res.* 2005, 84(1): 9-20.

Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9 (Suppl 1): S1.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003; 423(6937): 337-342.

Brechtler AB, Lerner UH. Bradykinin potentiates cytokine-induced prostaglandin biosynthesis in osteoblasts by enhanced expression of cyclooxygenase 2, resulting in increased RANKL expression. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(3): 910-923.

Brechtler AB, Persson E, Lundgren I, Lerner UH. Kinin B1 and B2 receptor expression in osteoblasts and fibroblasts is enhanced by interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. Effects dependent on activation of NF-kappaB and MAP kinases. *Bone.* 2008; 43(1): 72-83.

Brunius G, Domeij H, Gustavsson A, Yucel-Lindberg T. Bradykinin upregulates IL-8 production in human gingival fibroblasts stimulated by interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha. *Regul Pept.* 2005; 126(3): 183-188.

Buduneli N, Kinane DF. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2011; 38 Suppl 11: 85-105.

Burch RM, Axelrod J. Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84(18): 6374-6378.

Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G *et al.* The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol.* 1999; 145(3): 527-538.

Cardoso CR, Garlet GP, Crippa GE, Rosa AL, Júnior WM *et al.* Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24: 1–6.

Cardoso CR, Garlet GP, Moreira AP, Júnior WM, Rossi MA *et al.* Characterization of CD4+CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *J Leukoc Biol.* 2008; 84(1):311-318.

Chang CI, Liao JC, Kuo L. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am J Physiol.* 1998; 274(1 Pt 2): H342-348.

Cobb CM. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planing. *J Clin Periodontol.* 2002; 29 (Suppl 2): 6-16.

Costerton JWL, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol.* 1994; 176(8): 2137-2142.

Couture R, Harrison M, Vianna RM, Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol.* 2001; 429(1-3): 161-176.

Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B *et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature.* 2003; 421(6924): 744-748.

Cutler CW, Jotwani R. Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontol 2000.* 2004; 35: 135-157.

Daoussis D, Andonopoulos AP, Liossis SN. Wnt pathway and IL-17: novel regulators of joint remodeling in rheumatic diseases. Looking beyond the RANK-RANKL-OPG axis. *Semin Arthritis Rheum.* 2010; 39(5): 369-383.

Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(7): 481-490.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(2): 167-193.

Erdemir EO, Duran I, Haliloglu S. Effects of smoking on clinical parameters and the gingival crevicular fluid levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2004; 31(2): 99-104.

Evans DM, Ralston SH. Nitric Oxide and Bone. *J Bone Miner Res.* 1996; 11 (3): 300-305.

Gaffen SL, Hajishengallis G. A New Inflammatory Cytokine on the Block: Re-thinking Periodontal Disease and the Th1/Th2 Paradigm in the Context of Th17 Cells and IL-17. *J Dent Res.* 2008; 87(9): 817-828.

Gainet J, Chollet-Martin S, Brion M, Hakim J, Gougerot-Pocidalo MA *et al.* Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with rapidly progressive periodontitis: an amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation. *Lab Invest.* 1998; 78(6): 755-762.

Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res.* 2010; 89(12): 1349-1363.

Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 1997; 14: 112-143.

Gershon RK, Cohen P, Hencin R, Liebhaver SA. Suppressor T cells. *J Immunol.* 1972; 108(3): 586-590.

Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2003; 74(3): 391-401.

Gustafson GT, Lerner U. Bradykinin stimulates bone resorption and lysosomal-enzyme release in cultured mouse calvaria. *Biochem J.* 1984; 219(1): 329-332.

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL *et al.* Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005; 6(11): 1123-1132.

Haynes DR, Atkins GJ, Loric M, Crotti TN, Geary SM *et al.* Bidirectional signaling between stromal and hemopoietic cells regulates interleukin-1 expression during human osteoclast formation. *Bone.* 1999; 25(3): 269-278.

Heitz-Mayfield LJ. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 Suppl 6: 196-209.

Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A *et al.* Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(7): 3540-3545.

Ikeda T, Kasai M, Suzuki J, Kuroyama H, Seki S *et al.* Multimerization of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) isoforms and regulation of osteoclastogenesis. *J Biol Chem.* 2003; 278(47): 47217-4722.

Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology.* 2001; 142(4): 1419-1426.

Imamura T, Pike RN, Potempa J, Travis J. Pathogenesis of periodontitis: a major arginine-specific cysteine proteinase from *Porphyromonas gingivalis* induces vascular permeability enhancement through activation of the kallikrein/kinin pathway. *J Clin Invest.* 1994; 94(1): 361-367.

Jansen ID, Vermeer JA, Bloemen V, Stap J, Everts V. Osteoclast fusion and fission. *Calcif Tissue Int.* 2012 Jun; 90(6): 515-22.

Johnson IH. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *J Periodont Res.* 1975: 332-345.

Johnson RB, Serio FG. Interleukin-18 concentrations and the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol.* 2005; 76(5): 785-790.

Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, *et al.* B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol.* 2006; 169(3): 987-998.

Kinane DF, Preshaw PM, Loos BG; Working Group 2 of Seventh European Workshop on Periodontology. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions--consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2011; 38 (Suppl 11): 44-48.

Kinane DF. Periodontitis modified by systemic factors. *Ann Periodontol.* 1999; 4(1): 54-64.

Kornman KS. Mapping the Pathogenesis of Periodontitis: A New Look. *J Periodontol.* 2008; 79: 1560-1568.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998; 93(2): 165-176.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005; 201(2): 233-240.

Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev.* 2005; 57(1): 27-77.

Lerner UH. Bradykinin synergistically potentiates interleukin-1 induced bone resorption and prostanoid biosynthesis in neonatal mouse calvarial bones. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 175(3): 775-783.

Lerner UH. Regulation of bone metabolism by the kallikrein-kinin system, the coagulation cascade, and the acute-phase reactants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 78(4): 481-93.

Li YP, Chen W, Liang Y, Li E, Stashenko P. Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. *Nat Genet.* 1999; 23(4): 447-451.

Lindhe J, Rylander H. Experimental gingivitis in young dogs. *J Dent Res.* 1975; 83(6): 314-326.

Lindhe J, Rylander H. Experimental gingivitis in young dogs. *Scand J Dent Res.* 1975; 83(6): 314-326.

Ljunggren O, Lerner UH. Evidence for BK1 bradykinin-receptor-mediated prostaglandin formation in osteoblasts and subsequent enhancement of bone resorption. *Br J Pharmacol.* 1990; 101(2): 382-386.

Ljunggren O, Rosenquist J, Ransjö M, Lerner UH. Bradykinin stimulates prostaglandin E2 formation in isolated human osteoblast-like cells. *Biosci Rep.* 1990; 10(1): 121-126.

Löe H, Ånerud Å, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol.* 1986; 13(5): 431-445.

Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol.* 1965; 36: 177-187.

Loiola RA, Reis FC, Kawamoto EM, Scavone C, Abdalla DS, Fernandes L, Pesquero JB. Role of vascular Kinin B1 and B2 receptors in endothelial nitric oxide metabolism. *Peptides.* 2011; 32(8): 1700-1705.

Molinaro G, Cugno M, Perez M, Lepage Y, Gervais N, *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema is characterized by a slower degradation of des-arginine(9)-bradykinin. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 303(1): 232-237.

Monteiro AC, Schmitz V, Morrot A, de Arruda LB, Nagajyothi F *et al.* Bradykinin B2 Receptors of dendritic cells, acting as sensors of kinins proteolytically released by *Trypanosoma cruzi*, are critical for the development of protective type-1 responses. *PLoS Pathog.* 2007; 3(11): e185.

Monteiro AC, Schmitz V, Svensjo E, Gazzinelli RT, Almeida IC *et al.* Cooperative activation of TLR2 and bradykinin B2 receptor is required for induction of type 1 immunity in a mouse model of subcutaneous infection by *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 2006; 177(9): 6325-6335.

Monteiro AC, Scovino A, Raposo S, Gaze VM, Cruz C, *et al.* Kinin danger signals proteolytically released by gingipain induce Fimbriae-specific IFN-gamma- and IL-17-producing T cells in mice infected intramucosally with *Porphyromonas gingivalis*. *J Immunol.* 2009; 183(6): 3700-3711.

Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T *et al.* Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2003; 198(12): 1951-1957.

Niedbala W, Alves-Filho JC, Fukada SY, Vieira SM, Mitani A, *et al.* Regulation of type 17 helper T-cell function by nitric oxide during inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(22): 9220-9225.

Nussbaum G, Shapira L. How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis? *J Clin Periodontol.* 2011; 38 Suppl. 11: 49–59.

Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000.* 1997; 14: 216-248.

Pan ZK, Zuraw BL, Lung CC, Prossnitz ER, Browning DD, Ye RD. Bradykinin stimulates NF-kappaB activation and interleukin 1beta gene expression in cultured human fibroblasts. *J Clin Invest.* 1996; 98(9): 2042-2049.

Pesquero JB, Pesquero JL, Oliveira SM, Roscher AA, Metzger R, Ganten D et al. Molecular cloning and functional characterization of a mouse bradykinin B1 receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 220(1): 219-225.

Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol.* 2011; 38 (Suppl. 11): 60–84.

Pugliese LS, Gonçalves TO, Popi AF, Mariano M, Pesquero JB, Lopes JD. B-1 lymphocytes differentiate into functional osteoclast-like cells. *Immunobiology.* 2012; 217(3): 336-344.

Regoli D, Barabé J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev.* 1980; 32(1): 1-46.

Research, Science and Therapy Committee of The American Academy of Periodontology. Position Paper: tobacco use and the periodontal patient. *J Periodontol.* 1999, 70(11): 1419-1427.

Rhaleb NE, Dions S, Barabé J, Rouissi N, Drapeau G, Regoli D. Receptors for kinins in isolated arterial vessels of the dog. *Eur J Pharmacol.* 1989; 162(3): 419-427.

Rosloniec EF, Latham K, Guedez YB. Commentary: Paradoxical roles of IFN- $\gamma$  in models of Th1-mediated autoimmunity. *Arthritis Res.* 2002; 4(6): 333-336.

Sabatini RA, Guimarães PB, Fernandes L, Reis FC, Bersanetti PA, Mori MA et al. ACE activity is modulated by kinin B2 receptor. *Hypertension.* 2008; 51(3): 689-695.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, and Toda M. Pillars Article: Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing IL-2 Receptor  $\alpha$ -Chains

(CD25). Breakdown of a Single Mechanism of Self-Tolerance Causes Various Autoimmune Diseases. *J. Immunol.* 1995. 155: 1151–1164. *J Immunol.* 2011; 186: 3808-3821.

Santos EL, de Picoli Souza K, da Silva ED, Batista EC, *et al.* Long term treatment with ACE inhibitor enalapril decreases body weight gain and increases life span in rats. *Biochem Pharmacol.* 2009; 78(8): 951-958.

Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y *et al.* Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med.* 2006; 203(12): 2673-2682.

Schenkein HA. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2006; 40: 77-93.

Schmid J, Cohen RL, Chambers DA. Plasminogen activator in human periodontal health and disease. *Arch Oral Biol.* 1991; 36(3): 245-250.

Schulze-Topphoff U, Prat A, Prozorovski T, Siffrin V, Paterka M, Herz J, Bendix I *et al.* Activation of kinin receptor B1 limits encephalitogenic T lymphocyte recruitment to the central nervous system. *Nat Med.* 2009; 15(7): 788-793.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997; 89(2): 309-319.

Slavkin HC. Biofilms, microbial ecology and Antoni van Leeuwenhoek. *J Am Dent Assoc.* 1997; 128(4): 492-495.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25(2): 134-144.

Sundqvist G, Lerner UH. Bradykinin and thrombin synergistically potentiate interleukin 1 and tumour necrosis factor induced prostanoid biosynthesis in human dental pulp fibroblasts. *Cytokine*. 1996; 8(2): 168-177.

Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M *et al*. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol*. 1998; 10(12): 1969-1980.

Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S *et al*. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature*. 2000; 408(6812): 600-605.

The American Academy of Periodontology. Glossary of Periodontal Terms 4th Edition. Chicago: The American Academy of Periodontology, 2001. p. 43.

Theilade E. The experimental gingivitis studies: the microbiological perspective. *J Dent Res*. 1996; 75(7): 1434-1438.

Thomas JG, Nakaishi LA. Managing the complexity of a dynamic biofilm. *J Am Dent Assoc*. 2006;137 (Suppl):10S-15S.

Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998; 188(2):287-296.

van't Hof RJ, Ralston SH. Cytokine-induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. *J Bone Miner Res*. 1997; 12(11): 1797-1804.

Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophil. *N Engl J Med*. 1989; 320(6): 365-376.

Yamaguchi T, Wing JB, Sakaguchi S. Two modes of immune suppression by Foxp3+ regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Semin Immunol.* 2011; 23(6): 424-430.

Ye H, Arron JR, Lamothe B, Cirilli M, Kobayashi T *et al.* Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature.* 2002; 418(6896): 443-447.

Zheng H, Yu X, Collin-Osdoby P, Osdoby P. RANKL stimulates inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production in developing osteoclasts. An autocrine negative feedback mechanism triggered by RANKL-induced interferon-beta via NF-kappaB that restrains osteoclastogenesis and bone resorption. *J Biol Chem.* 2006; 281(23): 15809-15820.

ZoBell CE, Anderson DQ. Observations on the multiplication of bacteria in different volumes of stored sewerage and the influence of oxygen tension and solid surfaces. *Biol Bull.* 1936; 71: 324-342.

## **PUBLICAÇÕES**

Gonçalves-Zillo TO, Pugliese LS, Sales VM, Mori MA, Squaiella-Baptistão CC, Longo-Maugéri IM, Lopes JD, de Oliveira SM, Monteiro AC, Pesquero JB. Increased bone loss and amount of osteoclasts in kinin B1 receptor knockout mice. *J Clin Periodontol*. 2013; 40(7): 653-660. doi: 10.1111/jcpe.12097. Epub 2013 Mar 28.

Pugliese LS, Gonçalves TO, Popi AF, Mariano M, Pesquero JB, Lopes JD. B-1 lymphocytes differentiate into functional osteoclast-like cells. *Immunobiology*. 2012; 217(3): 336-344. doi: 10.1016/j.imbio.2011.07.014. Epub 2011 Jul 20