



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARIA MÁRCIA MARQUES DA SILVA ARAGÃO

**NÍVEIS DE REABSORÇÃO ÓSSEA NA PERIODONTITE INDUZIDA POR
LIGADURA EM CAMUNDONGOS UTILIZANDO FIOS DE SEDA E ALGODÃO**

SOBRAL
2023

MARIA MÁRCIA MARQUES DA SILVA ARAGÃO

**NÍVEIS DE REABSORÇÃO ÓSSEA NA PERIODONTITE INDUZIDA POR
LIGADURA EM CAMUNDONGOS UTILIZANDO FIOS DE SEDA E ALGODÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará - UFC Campus Sobral como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Iracema Matos de Melo

SOBRAL

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A672n Aragão, Maria Márcia Marques da Silva.
NÍVEIS DE REABSORÇÃO ÓSSEA NA PERIODONTITE INDUZIDA POR LIGADURA EM
CAMUNDONGOS UTILIZANDO FIOS DE SEDA E ALGODÃO / Maria Márcia Marques da Silva
Aragão. – 2023.
46 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde, Sobral, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Iracema Matos de Melo.

1. Reabsorção óssea alveolar. 2. Periodontite. 3. Camundongos. 4. Inflamação. I. Título.
CDD 610

MARIA MÁRCIA MARQUES DA SILVA ARAGÃO

**NÍVEIS DE REABSORÇÃO ÓSSEA NA PERIODONTITE INDUZIDA POR
LIGADURA EM CAMUNDONGOS UTILIZANDO FIOS DE SEDA E ALGODÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará - UFC Campus Sobral como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em 28 / 04 / 2023

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Iracema Matos de Melo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceara (UFC)

Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner (Examinadora)
Universidade Federal do Ceara (UFC)

Profa. Jordania Marques de Oliveira Freire (Examinadora)
Universidade Federal do Ceara (UFC)

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria e Nilton, que estão em outro plano celestial;

A minha orientadora Prof^a Dr^a, Iracema, pela paciência e disposição para ajudar e querer sempre o melhor;

Aos amigos, como Luzia Hermínia que colaborou bastante nos experimentos e a todos que colaboraram direta ou indiretamente em prol da pesquisa.

RESUMO

A periodontite induzida em roedores tem sido amplamente utilizada para a compreensão do metabolismo ósseo, particularmente para avaliar condições cuja reabsorção é decorrente da instalação de um processo inflamatório, por se caracterizar como um modelo que resulta em reabsorção óssea alveolar (ROA). Assim, objetivou-se comparar os diferentes níveis de ROA em diferentes tempos de eutanásia utilizando fios de algodão e seda na periodontite induzida por ligadura em mandíbula de camundongos. Foram utilizados 78 camundongos *Swiss* machos, após aprovação na Comissão de Ética no Uso de animais (09/20). A periodontite foi induzida por inserção de fio de seda ou algodão nos primeiros molares mandibulares, e os animais foram eutanasiados após 3, 5, 7, 11, 14 e 21 dias. A ROA foi avaliada por macroscopia e a gengiva removida para quantificação dos níveis de TNF- α por ELISA. Amostras sanguíneas foram obtidas para dosagem dos níveis séricos de fosfatase alcalina óssea (FAO). O peso dos animais foi avaliado imediatamente antes da colocação da ligadura e no momento anterior à eutanásia. Foi observada ROA significativa ($p < 0,05$), em relação ao Naive, nos animais em que a periodontite foi induzida com fio de algodão, a partir do dia 5, tendo pico máximo aos 11 dias. No grupo induzido com fio de seda, essa ROA foi significativa ($p < 0,05$) a partir do dia 7, em relação ao Naive. Além disso, nos dias 3 e 5, a ROA foi maior ($p < 0,05$) nos animais com fio de algodão, em relação àqueles com fio de seda, sendo semelhante nos demais momentos de eutanásia. Em relação aos níveis de TNF- α , não foram observadas alterações significantes em nenhum dos fios em relação ao Naive. Ademais, houve aumento significativo ($p < 0,05$) de FAO em relação ao Naive, somente nos animais do grupo algodão, aos 11 dias. Sistemicamente, não foram observadas alterações significantes na variação de peso dos animais submetidos à periodontite quando comparado aos animais Naive. Pode-se concluir, portanto, que a ROA é alcançada tanto com a utilização de fios de seda e algodão, no entanto, é mais precocemente estabelecida quando da utilização do fio de algodão.

Palavras-chave: Reabsorção óssea alveolar; Periodontite; Camundongos; Inflamação.

ABSTRACT

Induced periodontitis in rodents has been widely used to understand bone metabolism, particularly to assess conditions whose resorption is due to the installation of an inflammatory process, as it is characterized as a model that results in alveolar bone resorption (ABR). Thus, the objective was to compare the different levels of ABR at different times of euthanasia using cotton and silk threads in periodontitis induced by ligation in the mandible of mice. 78 male Swiss mice were used, after approval by the Committee on Ethics in the Use of Animals (09/20). Periodontitis was induced by inserting a silk or cotton thread in the mandibular first molars, and the animals were euthanized after 3, 5, 7, 11, 14 and 21 days. ABR was evaluated by macroscopy and the gingiva was removed for quantification of TNF- α levels by EILSA. Blood samples were obtained for measurement of serum levels of bone alkaline phosphatase (BALP). The weight of the animals was evaluated immediately before the placement of the ligature and at the moment before euthanasia. Significant ($p < 0,05$) ABR was observed, in relation to Naive, in animals in which periodontitis was induced with cotton thread, from day 5, with a maximum peak at day 11. In the group induced with silk thread, this ABR was significant ($p < 0,05$) from day 7 onwards, compared to Naive. In addition, on days 3 and 5, the ABR was higher ($p < 0,05$) in animals with cotton thread, compared to those with silk thread, being similar in the other moments of euthanasia. Regarding TNF- α levels, no significant changes were observed in any of the threads compared to Naive. Furthermore, there was a significant increase ($p < 0,05$) in BALP compared to Naive, only in the cotton group, at 11 days. Systemically, no significant changes were observed in the weight variation of animals submitted to periodontitis when compared to Naive animals. It can be concluded, therefore, that the ABR is achieved both with the use of silk and cotton threads, however, it is established earlier when using cotton thread.

Keywords: Alveolar bone resorption; Periodontitis; Mice; Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Reabsorção óssea (JCE-COA) na mandíbula de camundongos submetidos à periodontite.	26
Figura 2: Comparação entre reabsorção óssea (JCE-COA) na mandíbula de camundongos submetidos à periodontite com fios de algodão ou seda.	27
Figura 3: Aspecto macroscópico das mandíbulas.	28
Figura 4: Níveis gengivais de TNF- α em camundongos submetidos à periodontite.	29
Figura 5: Comparação dos níveis gengivais de TNF- α em camundongos submetidos à periodontite com fios de algodão ou seda.	30
Figura 6: Níveis séricos de fosfatase alcalina óssea em camundongos submetidos à periodontite.	31
Figura 7: Comparação dos níveis séricos de fosfatase alcalina óssea em camundongos submetidos à periodontite com fios de algodão ou seda.	32
Figura 8: Variação de massa corpórea em camundongos submetidos à periodontite.	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cFMS – receptor do fator estimulador de colônias de macrófagos

ELISA- ensaio de imunoabsorção enzimática

FAO- fosfatase alcalina óssea

GCF- fluido crevicular gengival

IFN- γ - interferon gama

IGF-1- fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 ou Somatomedina C

IL-1, IL-6, IL-7, IL-10, IL-11, IL-13, IL-17- interleucinas

JCE-COA- distância entre a junção cimento-esmalte e a crista óssea alveolar

LIF- fator inibidor de leucemia

M-CSF- fator estimulador de colônias de macrófagos

MMPs- metaloproteinases de matriz

NFATc1- fator nuclear de células T ativadas

OCIF- fator inibidor de osteoclastos

OMS- oncostatina M

OPG- osteoprotegerina

RANK- receptor ativador do fator nuclear Kappa B

RANKL- Fator Nuclear Kappa B

ROA- reabsorção óssea alveolar

TGF- β - fator de transformação de crescimento

TNF- fator de necrose tumoral

TNF- α e TNF-beta- fator de necrose tumoral alfa e beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Reabsorção óssea inflamatória	13
2.2 Doença periodontal	14
2.3 Modelos de indução da periodontite	16
3 JUSTIFICATIVA	19
4 HIPÓTESE	20
5 OBJETIVOS	21
6 METODOLOGIA	22
6.1 Desenho do estudo e aspectos éticos	22
6.2 Seleção de animais	22
6.3 Modelo de periodontite induzida por ligadura em camundongos	22
6.3.1 Análise Macroscópica da reabsorção óssea alveolar	23
6.3.2 ELISA para TNF-α	23
6.4 Análise sistêmica	24
6.4.1 Dosagem sérica da fosfatase alcalina óssea	24
6.4.2 Análise de Variação de massa corpórea	24
6.5 Análise estatística	24
7 RESULTADOS	25
8 DISCUSSÃO	34
9 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1 INTRODUÇÃO

O osso é um tecido notavelmente ativo, submetido à renovação constante em resposta à mecânica nutricional, e influências hormonais. Um equilíbrio entre o processo de reabsorção óssea pelos osteoclastos e formação óssea pelos osteoblastos são necessários em um adulto saudável (OATES, COCHRAN, 1996; BRUZZANITI, BARON, 2006; TEITELBAUM, 2000; TEITELBAUM, 2007). A taxa de reabsorção óssea pode ser regulada ao nível de diferenciação de osteoclastos de seu conjunto de precursores hematopoiéticos ou através da regulação de proteínas funcionais-chave que controlam as atividades de fixação, migração e reabsorção das células maduras (WIEBE, *et al.*, 1995; BARON, 1995; BRUZZANITI, BARON, 2006). A homeostase óssea é mantida por um processo fisiológico contínuo denominada remodelação. Este processo requer a atividade equilibrada de osteoblastos e osteoclastos. A atividade excessiva dos osteoclastos leva à reabsorção óssea patológica, incluindo a periodontite (NAKASHIMA, HAYASHI, TAKAYANAGI, 2012).

O osso alveolar é um tecido submetido à estimulação mecânica e passa por um ciclo contínuo de remodelação que se baseia principalmente nas atividades coordenadas de dois tipos de células principais: células da linhagem dos osteoblastos, incluindo osteoblastos, osteócitos e células do revestimento ósseo e células de reabsorção óssea, como os osteoclastos. Quando os osteoclastos são ativados, eles se fixam na superfície óssea e produzem prótons (H^+) e proteases para degradar a matriz óssea; depois disso, os osteoblastos sintetizam a matriz osteóide. Sob o regulamento de vários hormônios e citocinas, reabsorção óssea e a formação óssea estão conectadas e equilibradas, estabilizando o volume do osso alveolar (VIGNERY, BARON, 1980).

Os osteócitos são células da linhagem osteoblástica terminalmente diferenciadas e estão dentro do osso mineralizado. Os osteócitos atuam como comandantes do metabolismo ósseo, supervisionando as funções dos osteoblastos e osteoclastos. Os osteócitos são conhecidos por serem uma importante fonte de ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) (TSUKASAKI, TAKAYANAGI, 2019).

Como os osteoclastos são células de reabsorção óssea primária, estimulação local de sua atividade é um requisito essencial para a perda óssea alveolar (SAFFAR, LASFARGUES, CHERRUAU, 1997). Foi demonstrado que múltiplos mediadores, como IL-1, IL-6, IL-11, IL-17, TNF- α , TNF-beta, TGF- β , cininas e trombina podem estimular reabsorção óssea

(SCHWARTZ, *et al.*, 1997; TEITELBAUM, 2000; SAFFAR, LASFARGUES, CHERRUAU, 1997). A osteoclastogênese promovida patogênicamente foi apontada como uma das causas da reabsorção óssea alveolar, um resultado patogênico característico comum na periodontite. No contexto da doença periodontal, as respostas imunes do hospedeiro mediadas por células T e B contra componentes bacterianos podem induzir a ativação de osteoclastos com base na produção do RANKL por linfócitos ativados (KAJIYA, *et al.* 2010; KAYAL, 2013).

Periodontite é iniciada pela disbiose do biofilme da placa subgengival; no entanto, são as respostas imunes do hospedeiro contra componentes bacterianos invasores e bactérias que medeiam predominantemente a destruição do tecido periodontal (KINANE, STATHOPOULOU, PAPAPANOU, 2017). O infiltrado inflamatório celular de células T, células B, macrófagos e neutrófilos dentro do tecido conjuntivo gengival encontra-se aumentado, com um aumento na secreção de mediadores inflamatórios (DI BENEDETTO, *et al.* 2013; YUCEL-LINDBERG, BAGE, 2013).

Embora o modelo de periodontite seja amplamente utilizado na literatura para o estudo de processos reabsortivos ósseos inflamatórios, existe uma grande variedade de protocolos de indução da doença. Dessa forma, o presente projeto de pesquisa objetiva comparar a reabsorção óssea alveolar utilizando fio de seda e algodão na periodontite induzida em mandíbula de camundongos em uma curva temporal de indução da doença. Considerando dessa forma definir um melhor tempo de eutanásia na doença periodontal experimental em camundongos, bem como as diferenças alcançadas conforme o fio utilizado, para compreender o processo de instalação e progressão da doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Reabsorção óssea inflamatória

O osso é um tecido conjuntivo constituído por células, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos e uma matriz extracelular de proteoglicanos e colágeno mineralizado por deposição de hidroxiapatita de cálcio (TAT *et al.*, 2009). Os osteoclastos são as células envolvidas na reabsorção óssea, sendo a sua atividade essencial para a remodelação óssea. A diferenciação e ativação dessas células estão intimamente relacionadas ao sistema do receptor ativador do fator nuclear κ B (RANK)/seu ligante (RANKL)/osteoprotegerina (OPG), e a sua regulação é essencial para a promoção de reabsorção óssea (BURR, ALLEN, 2014; LERNER, 2004; XU, TEITELBAUM, 2013).

A ativação dos osteoclastos depende da interação entre o RANKL, presente nos osteoblastos e linfócitos T, e o RANK, encontrado nos pré-osteoclastos, além de células dendríticas, fibroblastos e linfócitos T (KOHLI, KOHLI, 2011). A ligação do RANKL ao seu receptor, RANK, resulta na ativação do fator de transcrição conhecido por fator nuclear de células T ativadas, citoplasmático 1 (NFATc1), tanto pela via NF κ B/AP-1/c-fos como pela sinalização pelo cálcio. Esse fator de transcrição, por sua vez, é responsável pela indução de genes osteoclásticos específicos necessários para ativação dessas células (TAKAYANAGI, *et al.*, 2002).

A OPG foi inicialmente descoberta por Tsuda (1997), como fator inibidor de osteoclastos (OCIF). Esta molécula, tal como o RANK, é membro da superfamília de receptores do TNF, e possui uma sequência homóloga ao RANK. Assim, apresenta uma elevada afinidade para o RANKL, ligando-se competitivamente a este, impedindo a sua ligação ao RANK. Isto faz com que não ocorra a ativação do RANK, o que resulta na inibição da diferenciação osteoclástica (HIENZ, PALIWAL, IVANOVSKI, 2015; LERNER, 2004; LORENZO, *et al.*, 2015).

A diferenciação dessas células também é regulada pelo fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), que agindo sobre seu receptor (cFMS), é essencial para proliferação, sobrevivência e fusão de células mononucleadas precursoras de osteoclastos, assim como pelo aumento da sobrevivência de osteoclastos maduros (TAKAYANAGI, 2007; PACIFICI, 2010). A literatura tem mostrado que o RANKL e o M-CSF são essenciais para a renovação osteoclástica fisiológica, enquanto citocinas adicionais são responsáveis pela supra-regulação de osteoclastos. De fato, tal processo envolve diversas células, citocinas e receptores,

confirmando, portanto, sua intrínseca relação com o sistema imune e à resposta inflamatória (PACIFICI, 2010; BRAUN, SCHETT, 2012).

Assim, processos inflamatórios podem influenciar a formação e ativação dos osteoclastos (KOHLI, KOHLI, 2011), uma vez que mediadores inflamatórios aumentam a expressão de RANKL (HIENZ, PALIWAL, IVANOVSKI, 2015). A estimulação da expressão do RANKL pode ser feita através de uma grande variedade desses mediadores inflamatórios, como a interleucina (IL)-1, IL-6, IL-7, IL-11, IL-17, o fator de necrose tumoral (TNF)- α , fator inibidor de leucemia (LIF), a oncostatina M (OSM) e a bradicinina (COCHRAN, 2008; HAJISHENGALLIS, 2014; HIENZ, PALIWAL, IVANOVSKI, 2015; LERNER, 2004; NEWMAN, *et al.*, 2012). Também existem mediadores que diminuem os níveis de RANKL e inibem a osteoclastogênese, tais como a calcitonina, o interferon gama (IFN- γ), o fator de transformação de crescimento (TGF)- β , as IL-10 e IL-13, entre outros (HAJISHENGALLIS, 2014; HIENZ, PALIWAL, IVANOVSKI, 2015).

Diversos modelos experimentais são utilizados a fim de uma melhor compreensão sobre o tecido ósseo e os processos de reabsorção e formação óssea, assim como para avaliação da atividade de fármacos ou biomateriais em tais processos. A periodontite induzida em roedores tem sido amplamente utilizada para esse objetivo, particularmente para avaliar condições cuja reabsorção é decorrente da instalação de um processo inflamatório, por se caracterizar como um modelo que resulta em reabsorção óssea alveolar significativa (LIMA, *et al.*, 2000; LIMA, *et al.*, 2004, BEZERRA, *et al.*, 2000).

2.2 Doença periodontal

A doença periodontal é considerada a doença dentária localizada e inflamatória mais comum (TARIQ, *et al.*, 2012), iniciada por comunidades bacterianas disbióticas nas superfícies dentárias subgingivais (DARVEAU, 2010; HAJISHENGALLIS, LAMONT, 2012) e caracterizada por destruição inflamatória do osso alveolar e tecidos conjuntivos que circundam e sustentam os dentes (PIHLSTROM, MICHALOWICZ, JOHNSON, 2005). A periodontite representa um distúrbio osteoimune típico caracterizado por inflamação do periodonto e destruição do osso alveolar que é uma das principais causas da perda dentária em adultos (TSUKASAKI, TAKAYANAGI, 2019).

A periodontite é uma das doenças crônicas mais comuns no mundo, chegando a afetar 750 milhões de pessoas. Apresenta uma prevalência de 50% nos adultos, no entanto este valor aumenta com o avanço da idade, chegando a atingir valores entre 70-90% em indivíduos com

idades compreendidas entre 60-74 anos. Embora seja registrada mais frequentemente em adultos e idosos, também pode ocorrer em crianças e adolescentes como consequência do acúmulo crônico de placa bacteriana e cálculo (NEWMAN, *et al.*, 2012; WANG, 2015). A periodontite severa afeta 10-15% dos adultos na maioria das populações e variou de 1% (entre 20 e 29 anos) a 39% (entre indivíduos com 65 anos ou mais), enquanto a periodontite moderada afeta 40-60% dos adultos em todas as populações (CHUNG, *et al.*, 2016).

A etiologia da doença periodontal é multifatorial, em que a presença de um biofilme disbiótico em íntimo contato com a margem gengival inicia a resposta imune inflamatória (HAJISHENGALLIS, CHAVAKIS, LAMBRIS, 2000; DE MOLON, *et al.*, 2022). O biofilme associado inicia a periodontite, mas não é totalmente suficiente para induzir a doença, pois a resposta imune do hospedeiro é crítica para o início e a progressão da doença (TSUKASAKI, *et al.*, 2018). A relação do microbioma para o desenvolvimento da periodontite é complexo. De acordo com análises microbiológicas de amostras de biofilme, sabe-se que as bactérias associadas ao início da doença são em grande parte comensais e os patógenos que são associados à doença em um estágio posterior são componentes muito menores do biofilme (KIRST, *et al.*, 2015). Nesta hipótese, o ambiente subgengival exerce pressão seletiva alterando a composição microbiana específica e impulsionando a mudança de saúde para doença (DYKE, BARTOLD, REYNOLDS, 2020).

Substâncias desse biofilme dental, como lipopolissacarídeos e toxinas, ativam uma resposta imune do hospedeiro levando à liberação de vários mediadores inflamatórios, como prostaglandina E₂, ILs e TNF- α , bem como enzimas proteolíticas, incluindo metaloproteinases de matriz (MMPs) (PAGE, KORNMAN, 1997; DARVEAU, 2010; YUCEL-LINDBERG, BAGE, 2013). Níveis elevados desses mediadores foram encontrados no fluido crevicular gengival (GCF) e saliva (FUJITA, *et al.*, 2012; ERTUGRUL, *et al.*, 2013; RATHNAYAKE, *et al.*, 2013) em casos de periodontite, e numerosos estudos foram realizados para investigar sua utilidade como potencial marcador biológico para periodontite (BUDUNELI, KINANE, 2011; DE LIMA, *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo pode desencadear morte celular, respostas inflamatórias e perturbação da homeostase tecidual (POUROVÁ, *et al.*, 2010; LIU, *et al.*, 2017). De fato, evidências acumuladas indicam que o estresse oxidativo desempenha um papel central no tecido periodontal e na destruição do osso alveolar (KURITA-OCHIAI, *et al.*, 2015).

De forma semelhante ao que ocorre em outras doenças inflamatórias reabsortivas, um mecanismo importante que influencia o desenvolvimento da doença periodontal envolve o eixo RANK/RANKL/OPG (CHEN, *et al.*, 2014). Estudos pré-clínicos têm demonstrado a relação do RANKL produzido por células T ativadas na reabsorção óssea em modelos de periodontite (TENG, *et al.*, 2000; TENG, 2002). Além disso, clinicamente, há relatos de que os níveis de RANKL são mais elevados em pacientes com doença periodontal (CROTTI, *et al.*, 2003; WARA-ASWAPATI, *et al.*, 2007), associado à redução dos níveis de OPG (CROTTI, *et al.*, 2003). Apesar de não existir um consenso entre autores, acredita-se que são três as citocinas pró-inflamatórias mais relevantes na estimulação da reabsorção óssea osteoclástica mediada por RANKL na periodontite, IL-1, IL-6 e TNF (ANTONINI, *et al.*, 2013; HIENZ, PALIWAL, IVANOVSKI, 2015).

A diminuição da perda óssea alveolar é um dos maiores desafios clínicos no tratamento da periodontite. Visto que a reabsorção óssea está intimamente relacionada com a regulação do sistema RANKL/RANK/OPG, a investigação e realização de estudos sobre os processos biológicos envolvidos neste sistema são de máxima importância na aquisição de maior conhecimento e de novas perspectivas sobre a doença, com o objetivo de fornecer informações para o desenvolvimento de novas modalidades de diagnóstico e terapêuticas (COCHRAN, 2008; HIENZ, PALIWAL, IVANOVSKI, 2015).

2.3 Modelos de indução da periodontite

A indução da periodontite tem sido bastante mencionada na literatura em busca de conhecer a progressão da doença e buscar métodos terapêuticos, bem como tem sido avaliada em diferentes espécies animais, como roedores, cães e coelhos e utilizando métodos de indução de formas variadas, sendo uma das mais utilizadas nos últimos anos, a periodontite induzida por ligadura (LIU, *et al.*, 2019).

A periodontite é uma doença inflamatória prevalente em humanos e cães, afetando 20% a 50% da população humana global e até 84% nos cães (NAZIR, 2017). Vários biomarcadores para periodontite foram identificados na saliva e no fluido crevicular gengival, incluindo S100A8 e S100A9. (TENG, SODEK, MCCULLOCH, 1992; HAIGH, *et al.*, 2010). O estudo de Liu, *et al.*, 2019 teve como objetivo monitorar alterações nos níveis de S100A8 e S100A9 na saliva, durante o desenvolvimento e tratamento da periodontite e avaliar sua capacidade de identificar a periodontite em um modelo de periodontite canina induzida por

ligadura. Um total de 15 cães beagle (seis fêmeas e nove machos) com idade 12 meses de idade foram então aleatoriamente divididos em grupo controle (sem ligadura), grupo 1 (ligadura em seis dentes), e grupo 2 (ligadura em 12 dentes). Os cães do grupo 1 receberam ligaduras no segundo, terceiro e quarto pré-molares esquerdo e direito da maxila. Os cães do grupo 2 receberam ligaduras nos terceiros e quartos pré-molares e primeiros molares nos lados esquerdo e direito da mandíbula usando fio seda 2-0 (LIU, *et al.*, 2019). A periodontite em cães foi associada a níveis aumentados de S100A8, S100A9, S100A8/A9 e MMP-9 na saliva.

A doença periodontal pode ocorrer naturalmente em um número reduzido de espécies, como cães ou primatas não humanos, mas a maioria dos estudos foi conduzida em modelos animais, especialmente em roedores, onde doença foi induzida experimentalmente (OZ, PULEO, 2011).

Os coelhos têm sido menos utilizados do que roedores em pesquisas periodontais, mas eles são frequentemente preferidos para pesquisas cardiovasculares devido às semelhanças no metabolismo das lipoproteínas entre coelhos e humanos e porque a sensibilidade de coelhos ao colesterol dietético leva a um rápido desenvolvimento de hipercolesterolemia grave com aterosclerose proeminente (FAN, *et al.*, 2014).

Nas últimas décadas, uma variedade de modelos de periodontite em camundongos foram estabelecidos e efetivamente aplicados à exploração do mecanismo da periodontite e a eficácia de novos tratamentos (GRAVES, *et al.*, 2008; MARCHESAN, *et al.*, 2018).

O estudo de Abe, *et al.*, em 2013 publicou a imagem e a descrição detalhada do método da indução de periodontite por ligadura em camundongos, dessa forma facilitando a técnica entre pesquisadores e sendo mais amplamente utilizada.

Nos últimos anos, alguns pesquisadores têm usado fios de nylon, seda e algodão para ligadura em camundongos e ratos (DE MOLON, *et al.*, 2014; FINE, *et al.*, 2021; OHNISHI, *et al.*, 2010). De fato, a administração oral de bactérias e injeção local de lipopolissacarídeo (LPS) ou *Porphyromonas gingivalis* também são métodos comumente usados para estabelecer a periodontite em camundongos (ROJAS, *et al.*, 2021).

Além disso, a administração bacteriana adicional em camundongos com periodontite induzida por ligadura mostrou um aumento na gravidade da periodontite (AKKAOUI, *et al.*, 2021; QI, *et al.*, 2019).

Outros estudos associaram a indução da periodontite por ligadura, com outros métodos como ligadura + lipossacarídeos, ligadura + *P. gingivalis*, ligadura com injeção de nicotina (AKKAOUI, *et al.*, 2021; CAO, *et al.*, 2021; KUBOTA, *et al.*, 2016). Entre os vários métodos empregados para mimetizar a periodontite em animais, o modelo mais utilizado é a indução por ligadura (DE MOLON *et al.*, 2013; DE MOLON, *et al.*, 2014; DE MOLON, *et al.*, 2016; PIRIH, *et al.*, 2015).

3. JUSTIFICATIVA

Atualmente, na literatura existem diferentes protocolos para a indução da periodontite em camundongos e em outras espécies animais, variando tanto no procedimento cirúrgico, materiais utilizados e tempo de eutanásia. Buscando investigar o processo de instalação e progressão da periodontite experimental, considerou-se importante comparar protocolos utilizando fios de seda e algodão em mandíbulas de camundongos em diferentes tempos de eutanásia, já que tem sido um dos modelos animais que tem apresentado uma reabsorção óssea significativa, com melhor manejo e menos custos financeiros. Assim, esperou-se encontrar o momento em que a doença é estabelecida, bem como o pico de reabsorção, investigando se há diferença conforme o material da ligadura. A pesquisa é importante, uma vez que a melhor compreensão do modelo permite o delineamento de estudos que investiguem abordagens farmacológicas em doenças ósseas inflamatórias, por meio da periodontite experimental em camundongos.

4. HIPÓTESE

A periodontite induzida por fios de algodão e seda resultam em diferentes picos de reabsorção óssea alveolar em camundongos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Comparar os diferentes níveis de reabsorção óssea alveolar nos diferentes tempos de eutanásia utilizando fio de algodão e seda na periodontite induzida por ligadura em mandíbula de camundongos.

5.2 Objetivos específicos

Avaliar diferentes protocolos de indução da periodontite por ligadura em camundongos, em relação ao tipo de fio e tempo de eutanásia.

Avaliar a perda óssea alveolar através de análises macroscópica do osso alveolar de camundongos submetidos à periodontite.

Avaliar a inflamação através da análise do tecido gengival por ELISA para TNF- α .

Avaliar indiretamente a atividade osteoblástica através da dosagem sérica de fosfatase alcalina óssea em camundongos submetidos à periodontite.

Avaliar o efeito sistêmico através de variação de massa corpórea de camundongos submetidos à periodontite.

METODOLOGIA

6.1 Desenho do estudo e aspectos éticos

Este foi um estudo prospectivo, randomizado, controlado e cego, utilizando modelos animais. Os pesquisadores envolvidos envidaram todos os esforços para reduzir ao mínimo o número de animais e o sofrimento destes, de acordo com os princípios éticos para uso de animais de laboratório. O projeto foi iniciado somente após aceito pela Comissão de Ética no Uso de Animais (09/20). Todo o processo de eutanásia dos animais foi realizado sob anestesia prévia por xilazina (10 mg/kg-im) e cetamina (90 mg/kg-im), seguida por superdosagem com as mesmas soluções que determinará parada cardiorrespiratória imediata.

6.2 Seleção de animais

Foram utilizados 78 camundongos *Swiss* machos, com massa corpórea entre 20 e 30 gramas. Esses animais foram procedentes do Biotério Central do Campus do Pici – UFC e mantidos em gaiolas apropriadas, em número de 6 animais em cada uma delas. Os animais receberam ração comercial balanceada adequada e água à vontade, e permaneceram nas mesmas condições ambientais de ciclos claros/escuros de 12 h e temperatura de 22 °C durante todo o experimento.

6.3 Modelo de periodontite induzida por ligadura em camundongos

A periodontite foi induzida pela inserção de uma ligadura (4.0) em torno dos primeiros molares inferiores esquerdos. Os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal, com 90 mg/kg de cloridrato de cetamina associado a 10 mg/kg de cloridrato de xilazina e foram colocados em decúbito ventral em uma mesa para roedores, com afastadores orais apoiados nos dentes incisivos. Para inserção do fio, foram utilizados espaçadores digitais endodônticos C, a fim de criar um espaço entre o primeiro e o segundo molar. A ligadura foi posicionada cuidadosamente no sulco gengival e o nó posicionado mesialmente. Os animais foram eutanasiados após 3, 5, 7, 11, 14 e 21 dias da indução da periodontite para definir o tempo ideal correspondente ao pico de reabsorção óssea alveolar (BONATO, *et al.*, 2012, OLIVEIRA, *et al.* 2019; PEREIRA, *et al.*, 2019; ABE, HAJISHENGALLIS, 2013). Dessa forma, os animais foram divididos nos grupos conforme o quadro 1.

Quadro 1: Grupos experimentais

Arcada	Indução da periodontite	Tipo de fio	Tempos de eutanásia	Quantidade de animal
Mandíbula	Sim	Seda 4.0	3, 5, 7, 11, 14 e 21 dias	36 (6 para cada tempo de eutanásia)
Mandíbula	Sim	Algodão 4.0	3, 5, 7, 11, 14 e 21 dias	36 (6 para cada tempo de eutanásia)
Mandíbula	Não (<i>Naïve</i>)	Não se aplica	21 dias	6

6.3.1 Análise macroscópica da reabsorção óssea alveolar

Após a eutanásia dos animais, suas mandíbulas foram removidas e fixadas em formol tamponado a 10%, durante 24 horas. A seguir, as arcadas foram separadas em duas hemiarçadas. A hemiarçada esquerda foi dissecada e corada com azul de metileno a 1%, com o objetivo de discriminar o osso dos dentes, os quais se coram em menor intensidade (LIMA, *et al.*, 2000; LIMA, *et al.*, 2004). Para a quantificação da reabsorção óssea, a hemiarçada foi acomodada com massa de modelar em lâminas para posterior fotografia em câmera digital Nikon™ (Nikon D40, Melville, NY, USA), com magnificação em lupa. As imagens foram, então, avaliadas junto ao programa de computador Image J (ImageJ 1.44p, National Institute of Health; EUA), considerando demarcação desde a junção cimento-esmalte até a borda óssea remanescente. Essa área foi comparada à outra previamente conhecida (5 x 5 mm²) (KUHR, *et al.*, 2004).

6.3.2 ELISA para TNF- α

Para o ELISA, foram coletados tecidos gengivais das hemiarçadas direitas e esquerda e congelados em -80 °C de 6 animais por grupo, para que fosse possível a realização das análises.

Os níveis gengivais de TNF- α foram, então, dosados nas referidas amostras. Para isso, os tecidos coletados foram homogeneizados e processados como descrito por Safieh-Garabedian, *et al.*, (1995). A detecção da proteína TNF- α foi determinada por ELISA, como descrito previamente (CUNHA, *et al.*, 1993). Resumidamente, placas para ELISA foram incubadas por 12 h a 4 °C com anticorpos de captura anti- TNF- α (2 μ g/ml). Após o bloqueio das placas, as amostras e a curva padrão foram adicionadas em duplicata em várias diluições e incubadas por 2 h a 4 °C. As placas foram lavadas três vezes com solução tampão e incubadas

com anticorpo de detecção durante 2 h. Após o período de incubação, as placas foram lavadas e 50 µL do complexo HRP-avidina diluído 1:200 foram adicionados. O reagente de cor o-fenilenodiamina (OPD, 50 µl) foi adicionado 15 min depois e as placas foram incubadas no escuro a 37 °C por 15 a 20 min. A reação enzimática foi parada com H₂SO₄ 2N e a absorbância medida em 450 nm. O resultado foi expresso em pg/ml.

6.4. Análise sistêmica

6.4.1 Dosagem sérica da fosfatase alcalina óssea

No momento da eutanásia, foram coletadas 0,5 ml de sangue por punção cardíaca de todos os camundongos submetidos à periodontite e do grupo naive. A dosagem da Fosfatase Alcalina Óssea (FAO) foi baseada na metodologia de inativação térmica (MOSS, WHITBY, 1975), e realizada no laboratório de Patologia Clínica SOS PET (Sobral-CE).

6.4.2 Análise da variação de massa corpórea

Todos os animais tiveram suas massas corpóreas medidas antes da cirurgia e, no momento anterior à eutanásia. Os valores encontrados foram expressos como a variação de massa corpórea (g) em relação à massa inicial.

6.5 Análise estatística

Os resultados paramétricos, de acordo com a normalidade, foram expressos como Média ± EPM. Para comparações entre os grupos foram utilizados: One Way Anova seguido pelo teste de Bonferroni, ou teste t de Student não pareado. Em todas as situações, foi adotado o nível de significância $p < 0,05$. Foi utilizado o programa de estatística GraphPad Prism[®] versão 5.0 (La Jolla-CA, EUA).

7 RESULTADOS

7.1 Reabsorção óssea alveolar (ROA)

A reabsorção óssea alveolar (ROA) foi analisada a partir da distância entre a junção cimento-esmalte e a crista óssea alveolar (JCE-COA), medida em mm^2 dos três molares mandibulares. Dessa forma, foi observada que a colocação do fio de algodão em torno dos primeiros molares mandibulares de camundongos induziu uma significativa ROA, em relação aos animais Naive, a partir do dia 5. Essa ROA apresentou uma curva ascendente no decorrer dos dias, com pico no 11º dia, em relação ao sétimo dia. Após esse pico, houve uma tendência à redução na ROA aos 14 e 21 dias de ligadura, retornando aos níveis semelhantes de ROA obtidos no 7º dia (Figura 1 A). A figura 1 B, mostra a curva de ROA em animais em que a periodontite foi induzida pela colocação do fio de seda em torno dos primeiros molares mandibulares. Diferente do observado com o fio de algodão, o fio de seda induziu ROA significativa, em relação aos animais Naive, somente a partir do dia 7. Essa ROA apresentou um pico no 11º dia. De forma semelhante ao observado com o fio de algodão, após esse pico, houve uma tendência de redução na ROA nos 14º e 21º dias, retornando aos níveis de ROA obtidos no 7º dia. O aspecto macroscópico das mandíbulas pode ser visualizado na figura 3, a saber intensa ROA, exposição das raízes e lesão de furca.

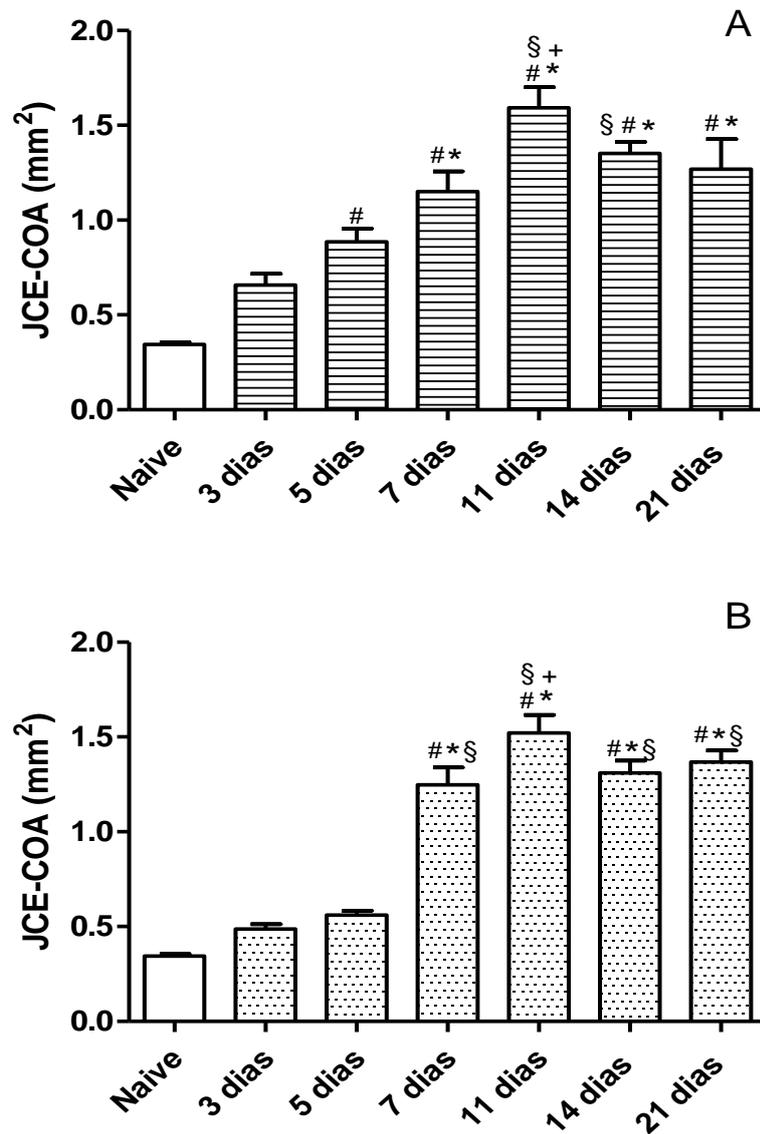


Figura 1: Reabsorção óssea (JCE-COA) na mandíbula de camundongos submetidos à periodontite. A periodontite foi induzida pela colocação de fio de algodão (A) ou seda (B) no primeiro molar inferior e os camundongos foram eutanasiados após 3, 5, 7, 11, 14 ou 21 dias. Os dados representam a média \pm EPM da reabsorção óssea, de 6 animais por grupo. # $p < 0,05$ em relação ao Naive, * $p < 0,05$ relação ao grupo 3 dias, § $p < 0,05$ em relação ao grupo 5 dias, + $p < 0,05$ em relação ao grupo 7 dias. (Anova, teste de Bonferroni).

Além das comparações entre os dias, para determinado tipo de fio, também foram realizadas comparações entre os tipos de fio, nos diferentes tempos de eutanásia. Foi observado que a ROA nos animais em que a periodontite foi induzida com fio de algodão foi significativamente maior do que naqueles em que a periodontite foi induzida com fio de seda,

nos dias 3 (Figura 2 A) e 5 (Figura 2 B). A partir do 7º até o 21º dia, essa ROA foi semelhante para os dois tipos de fio (Figura 2 C-F).

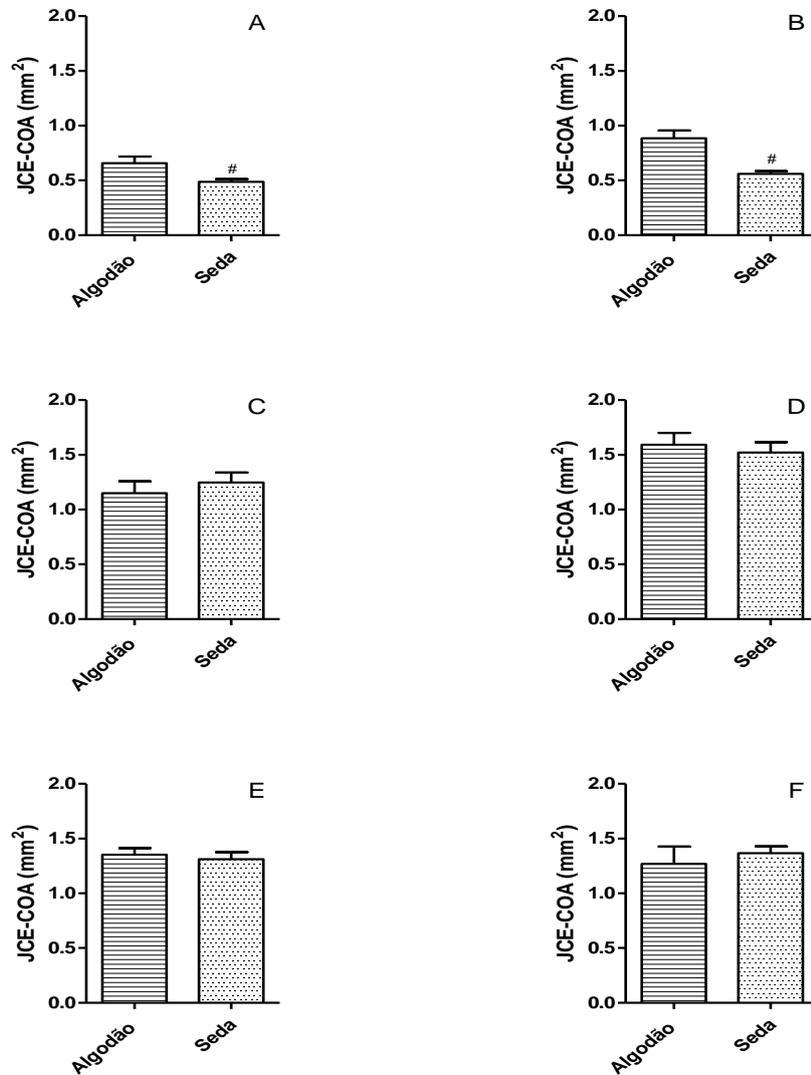


Figura 2: Comparação entre reabsorção óssea (JCE-COA) na mandíbula de camundongos submetidos à periodontite com fios de algodão ou seda. A periodontite foi induzida pela colocação de fio de algodão ou seda no primeiro molar inferior e os camundongos foram eutanasiados após 3 (A), 5 (B), 7 (C), 11 (D), 14 (E) ou 21 (F) dias. Os dados representam a média \pm EPM da reabsorção óssea alveolar, de 6 animais por grupo. [#]p<0,05 em relação ao grupo algodão (Test *t* de Student).

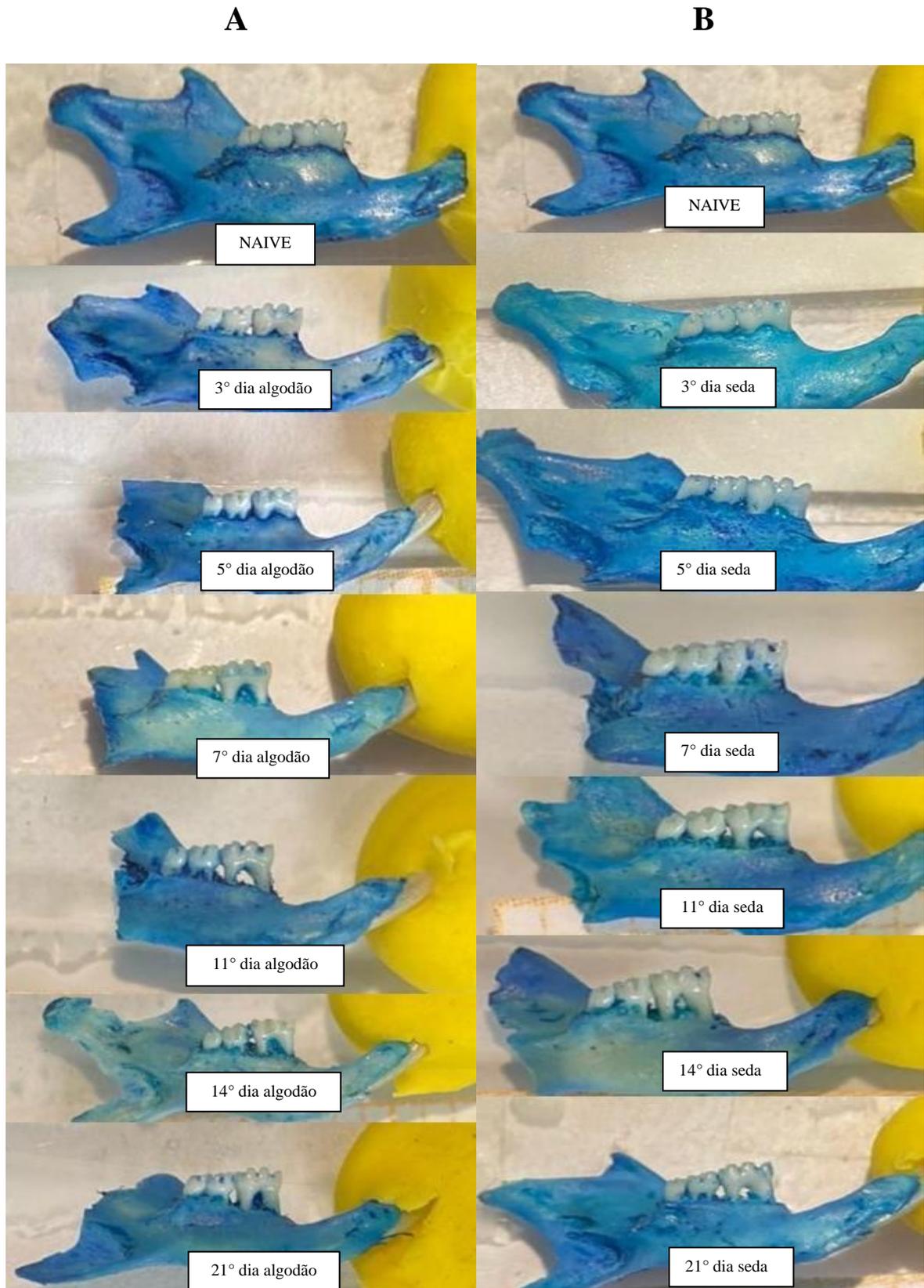


Figura 3: Aspecto macroscópico das mandíbulas. Mandíbulas dissecadas e coradas com azul de metileno nos grupos experimentais. Coluna A: algodão (naive, 3°, 5°, 7°, 11°, 14° e 21° dias) e coluna B: seda (naive, 3°, 5°, 7°, 11°, 14° e 21° dias).

7.2 Dosagem de TNF- α

Na figura 4 pode-se observar que a colocação do fio de algodão em torno dos primeiros molares mandibulares de camundongos, não promoveu alterações significantes nos níveis gengivais de TNF- α , em nenhum dos fios em relação ao Naive. Pontualmente, foram observadas diferenças significantes nos níveis dessa citocina, entre os animais do grupo algodão eutanasiados no 5º dia em relação àqueles eutanasiados no 14º dia, com níveis mais elevados de TNF- α no 5º dia. Ademais, no 11º dia, os níveis gengivais de TNF- α foram significantemente maiores nos animais do grupo algodão, em relação ao grupo seda (Figura 5D).

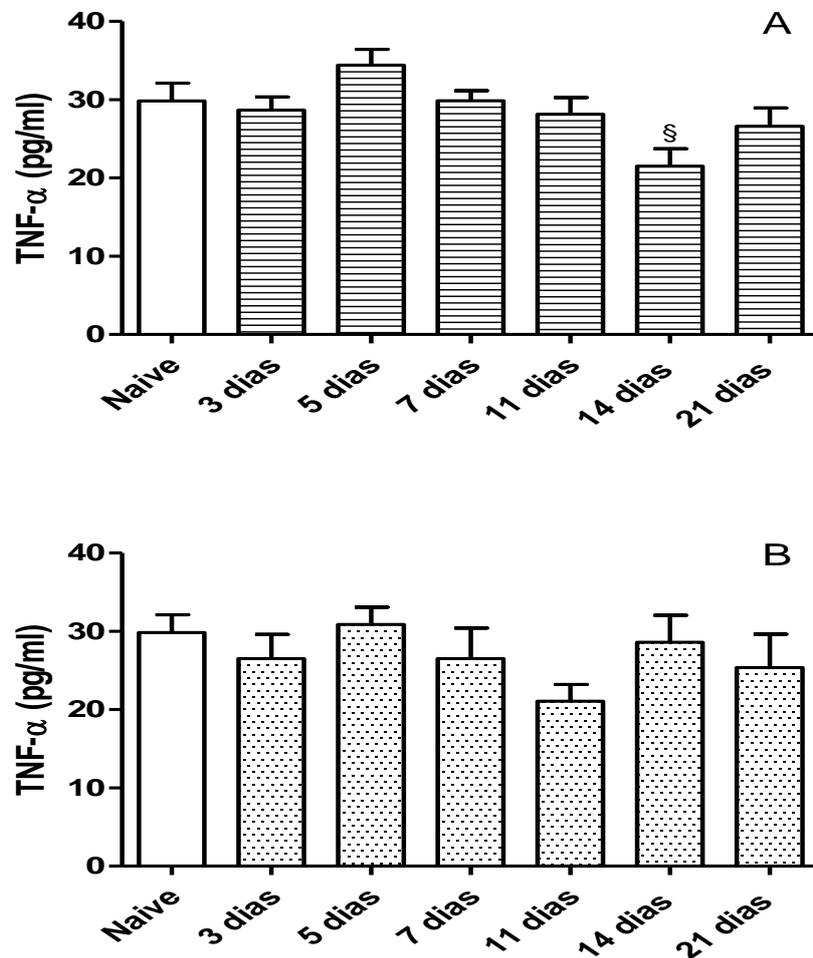


Figura 4: Níveis gengivais de TNF- α em camundongos submetidos à periodontite. A periodontite foi induzida pela colocação de fio de algodão (A) ou seda (B) no primeiro molar inferior e os camundongos foram eutanasiados após 3, 5, 7, 11, 14 ou 21 dias. Os dados representam a média \pm EPM dos níveis gengivais de TNF- α , de 6 animais por grupo. [§]p<0,05 em relação ao grupo 5 dias (Anova, teste de Bonferroni).

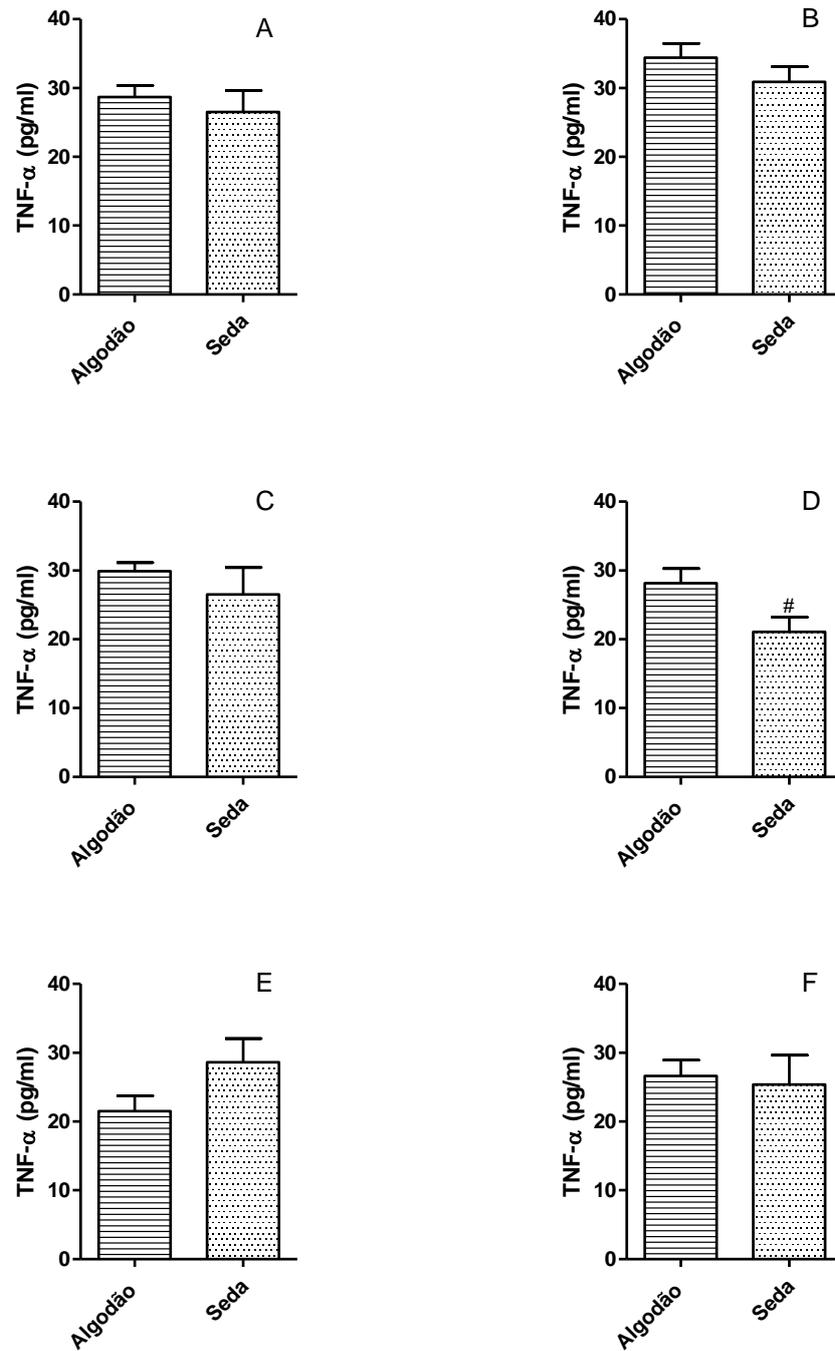


Figura 5: Comparação dos níveis gengivais de TNF- α em camundongos submetidos à periodontite com fios de algodão ou seda. A periodontite foi induzida pela colocação de fio de algodão ou seda no primeiro molar inferior e os camundongos foram eutanasiados após 3 (A), 5 (B), 7 (C), 11 (D), 14 (E) ou 21 (F) dias. Os dados representam a média \pm EPM dos níveis gengivais de TNF- α , de 6 animais por grupo. [#] $p < 0,05$ em relação ao grupo algodão (Test t de Student).

7.3 Dosagem sérica de fosfatase alcalina óssea (FAO)

Os níveis séricos de fosfatase alcalina óssea foram dosados no momento da eutanásia dos animais. Nos animais em que a periodontite foi induzida com o fio de algodão foi observado que um aumento significativo nos níveis dessa enzima, em relação aos valores normais (Naive), após 11 dias de ligadura (Figura 6 A). Além disso, nos dias 7, 11 e 21 foi observado um aumento significativo da FAO em relação ao observado no dia 3. Por outro lado, nos animais em que a periodontite foi induzida com o fio de seda foi observada uma redução significativa da FAO nos dias 14 e 21 em relação ao observado no dia 3 (Figura 6 B). Quando comparados os tipos fios, no 3º dia, os níveis de FAO foram significativamente maiores no grupo seda (Figura 7 A). Nos dias 11 e 21, por sua vez, esses valores foram significativamente menores nesse grupo, quando comparado ao grupo algodão (Figura 7 D e F).

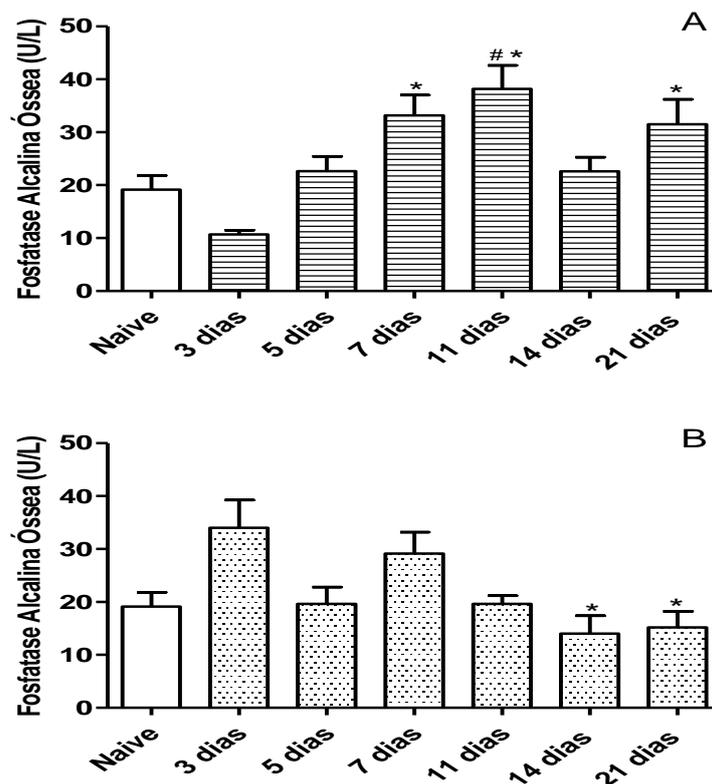


Figura 6: Níveis séricos de fosfatase alcalina óssea em camundongos submetidos à periodontite. A periodontite foi induzida pela colocação de fio de algodão ou seda no primeiro molar inferior e os camundongos foram eutanasiados após 3 (A), 5 (B), 7 (C), 11 (D), 14 (E) ou 21 (F) dias. Os dados representam a média \pm EPM dos níveis séricos de fosfatase alcalina óssea, de 6 animais por grupo. # $p < 0,05$ em relação ao Naive, * $p < 0,05$ relação ao grupo 3 dias (Anova, teste de Bonferroni).

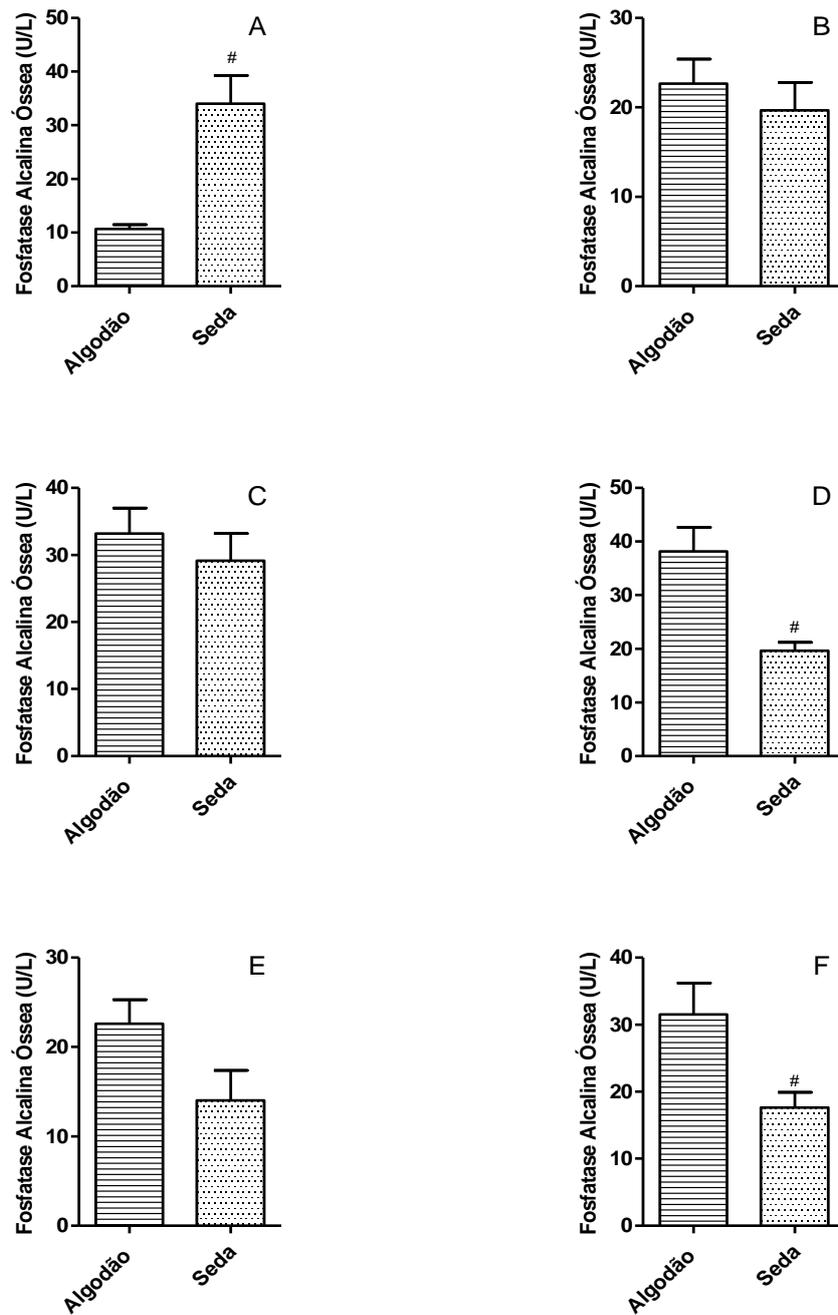


Figura 7: Comparação dos níveis séricos de fosfatase alcalina óssea em camundongos submetidos à periodontite com fios de algodão ou seda. A periodontite foi induzida pela colocação de fio de algodão (A) ou seda (B) no primeiro molar inferior e os camundongos foram eutanasiados após 3, 5, 7, 11, 14 ou 21 dias. Os dados representam a média \pm EPM dos níveis séricos de fosfatase alcalina óssea, de 6 animais por grupo. # $p < 0,05$ em relação ao grupo algodão (Test t de Student).

7.4 Variação de massa corpórea

Os animais tiveram suas massas corpóreas medidas antes da cirurgia e, imediatamente antes da eutanásia. Os valores encontrados foram expressos como a variação de massa corpórea (g) em relação à massa inicial (Figura 8). Não foram observadas alterações significantes na variação de peso dos animais submetidos à periodontite com os ambos os fios, em todos os momentos de eutanásia, quando comparado aos animais Naive.

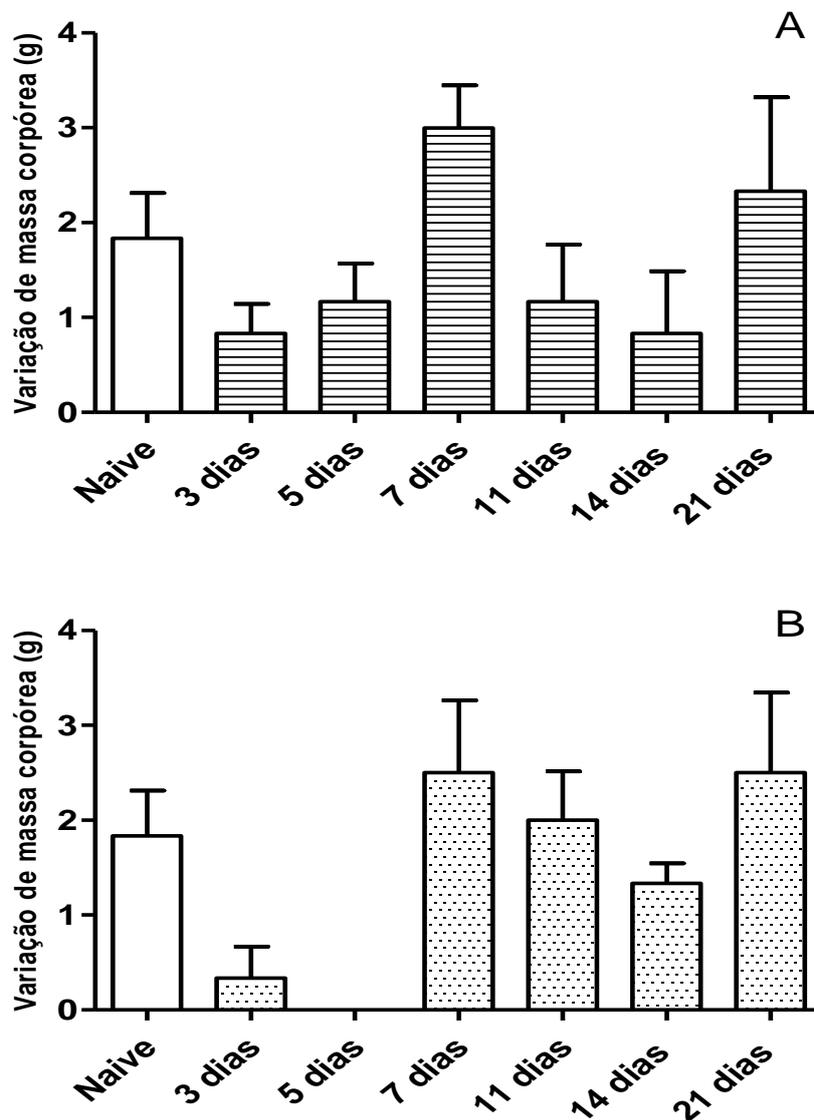


Figura 8: Variação de massa corpórea em camundongos submetidos à periodontite. A periodontite foi induzida pela colocação de fio de algodão (A) ou seda (B) no primeiro molar inferior e os camundongos foram eutanasiados após 3, 5, 7, 11, 14 ou 21 dias. Os dados representam a média \pm EPM da variação de massa corpórea, de 6 animais por grupo. Anova, teste de Bonferroni.

DISCUSSÃO

O estudo Global Burden of Disease (1990-2010) mostrou que as condições orais continuam a ser um importante problema de saúde pública; globalmente, 796 milhões de pessoas apresentam periodontite grave, enquanto 267 milhões de pessoas têm edentulismo total. Consequentemente, a periodontite é a sexta doença mais prevalente em todo o mundo (KASSEBAUM, *et al.*, 2014). Diversos modelos experimentais são utilizados a fim de uma melhor compreensão sobre o tecido ósseo e os processos de reabsorção e formação óssea, assim como para avaliação da atividade de fármacos ou biomateriais em tais processos. A periodontite induzida em roedores tem sido amplamente utilizada para esse objetivo, inclusive por nosso grupo de pesquisa, particularmente para avaliar condições cuja reabsorção é decorrente da instalação de um processo inflamatório, por se caracterizar como um modelo que resulta em reabsorção óssea alveolar significativa (LIMA, *et al.*, 2000; LIMA, *et al.*, 2004; BEZERRA, *et al.*, 2000).

Vários estudos sugeriram que o envelhecimento e o sexo afetam a periodontite induzida por ligadura (WENNSTRÖM, *et al.*, 1993; PAPANAOU, WENNSTROM, 1990; SKUDUTYTE-RYSSTAD, *et al.*, 2007; HUGOSON, NORDERYD, 2008; HUGOSON, *et al.*, 2008). Além disso, embora o modelo de periodontite seja amplamente utilizado na literatura para o estudo de processos reabsortivos ósseos inflamatórios, existe uma grande variedade de protocolos de indução da doença (GARLAT, *et al.*, 2006; KUBOTA, *et al.*, 2016; OLIVEIRA, *et al.*, 2019; AKKAOU, *et al.*, 2021; AN, *et al.*, 2021; TOMINA, *et al.*, 2022). Dessa forma, essa pesquisa objetivou comparar a reabsorção óssea alveolar utilizando fio de seda e algodão na periodontite induzida em mandíbula de camundongos em uma curva temporal de indução da doença. Considerando dessa forma definir um melhor tempo de eutanásia na doença periodontal experimental em camundongos, bem como as diferenças alcançadas conforme o fio. Em relação a indução de periodontite na mandíbula de camundongos, foi observada reabsorção óssea alveolar significativa, em relação ao Naive, nos animais em que a periodontite foi induzida com fio de algodão, a partir do dia 5, tendo pico máximo aos 11 dias, enquanto nos animais em que a periodontite foi induzida com fio de seda, essa reabsorção óssea alveolar foi significativa a partir do dia 7. Além disso, nos dias 3 e 5, a reabsorção óssea alveolar foi maior nos animais com fio de algodão, em relação àqueles com fio de seda. Assim, aparentemente a doença é mais precocemente estabelecida quando da utilização do fio de algodão.

De acordo com Candeo, *et al.* (2017), o protocolo de periodontite foi induzido por ligadura em mandíbula usando fio seda 6.0 no tempo de eutanásia de 15 dias em camundongos machos e observou-se aumento da reabsorção óssea no grupo periodontite quando comparado ao grupo controle (CANDEO, *et al.*, 2017). No estudo de Marchesan, *et al.* (2018), a periodontite foi avaliada por ligadura em maxila usando fio seda em camundongos fêmeas e observaram que a perda óssea alveolar óbvia é observada apenas a partir do 6º dia. Esses autores constataram que, no geral, a ativação dos osteoclastos e a perda óssea alveolar ocorrem principalmente na fase inicial (dias 3 a 9) e é seguido por uma diminuição na fase posterior 9º ao 18º dia (MARCHESAN, *et al.*, 2018). Apesar das diferenças de protocolo, nossos achados também mostram uma curva ascendente de ROA, com tendência à redução a partir do dia 14.

Em relação a modelos de periodontite, utilizando fio de algodão, Dos Santos, *et al.* (2022) demonstraram que inserção da ligadura usando fio algodão em ratos machos e eutanasiados com 14 dias resultou em importante perda óssea no grupo não tratado (DOS SANTOS, *et al.*, 2022). De forma semelhante, o estudo de De Almeida, *et al.* (2015), em que a periodontite foi induzida por ligadura em mandíbula de ratos machos usando fio algodão nº 24 e com eutanásia nos dias 14, 22 e 37, demonstrou perda óssea alveolar grave no grupo periodontite sem tratamento.

Semelhante ao protocolo utilizado em nosso estudo, fio 4.0 em mandíbulas de camundongos, Oliveira, *et al.* (2019) também verificaram perda óssea significativa, especificamente na região de furca do primeiro molar. Pereira, *et al.*, 2019, também relataram alto grau de perda óssea alveolar em mandíbula em camundongos fêmeas usando fio seda 5.0 e observaram acentuada perda óssea nos animais com periodontite, quando comparado ao grupo controle. Através do demonstrado, esses estudos mostram protocolos de periodontite realizados em camundongos machos e fêmeas em tempos de eutanásia semelhantes ao de nosso estudo e com perda óssea alveolar semelhante aos nossos achados.

As células imunes estão envolvidas na manutenção de um equilíbrio periodontal saudável. Os tecidos periodontais produzem várias citocinas pró-inflamatórias que participam da osteoclastogênese e degradação do colágeno na periodontite; estes incluem interleucinas (por exemplo, IL-1 α , IL-1 β e IL-6), fator de necrose tumoral- α , metaloproteinases e fator estimulante de colônias de granulócitos (HAJISHENGALLIS, SAHINGUR, 2014; KURGAN, KANTARCI, 2018). A literatura mostra que por se tratar de uma doença

inflamatória, diversos mediadores inflamatórios participam do processo de destruição tecidual na periodontite, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, prostaglandina E₂ e metaloproteinases de matriz (MMP) (YUCEL-LINDBERG, BÅGE, 2013). De fato, os níveis aumentados de interleucinas e TNF- α , observados na doença, favorecem a reabsorção óssea por estimularem a osteoclastogênese através da diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos maduros, pelo aumento da expressão do ligante do receptor ativador do fator nuclear κ -B (RANKL) e do seu receptor (RANK), e pela redução da expressão de osteoprotegerina (OPG) (YUCEL-LINDBERG, BÅGE, 2013).

Nesse contexto, considerando o papel do TNF- α na patogênese da doença, foi realizada a dosagem dos níveis gengivais dessa citocina em todos os tempos experimentais. No estudo de Ishii *et al.* (2022), o tecido periodontal isolado de camundongos com periodontite induzida por ligadura, os níveis de TNF- α , RANKL e IGF-1 foram todos significativamente maiores em comparação com o grupo controle sem ligadura (ISHII, *et al.*, 2022). Candeo, *et al.* (2017), relataram aumento na expressão de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no grupo periodontite quando comparado a ao grupo controle. Portanto, embora estudos em animais também relatem o aumento de TNF- α após a indução da periodontite (GUIMARÃES, *et al.*, 2016), no nosso estudo, não foram observadas diferenças significantes dos níveis de TNF- α em animais submetidos à periodontite em relação àqueles em que a doença não foi induzida.

Especificamente sobre o processo reabsortivo subjacente à periodontite, estudos prévios do nosso grupo de pesquisa correlacionam redução dos níveis de fosfatase alcalina óssea, enzima importante no processo de mineralização do osso, e a reabsorção óssea alveolar em ratos submetidos à periodontite (GUIMARÃES, *et al.*, 2016; GOES, *et al.*, 2019). No entanto, essa associação deve ser analisada com cautela, uma vez que a literatura também mostra o aumento sérico dessa enzima em doenças reabsortivas, como a osteoporose (NIZET *et al.*, 2020). Nossos achados indicam o aumento da FAO no 11º dia de ligadura com o fio de algodão, coincidindo, portanto, com o pico de reabsorção óssea alveolar.

Em nosso estudo não foram observadas alterações significantes na variação de peso dos animais submetidos à periodontite com os ambos os fios, em todos os momentos de eutanásia, quando comparado aos animais Naive. Pereira, *et al.* (2019) relataram que o grupo de animais com ligadura apresentou perda de peso em relação ao grupo controle, mas retornou rapidamente ao peso do grupo controle (PEREIRA, *et al.*, 2019). De acordo com Tomina, *et*

al. (2022), não houve diferenças estatisticamente significativas em relação ao peso em nenhum dos grupos experimentais ou o grupo de controle. No entanto, para o grupo controle, o ganho de peso foi maior.

CONCLUSÃO

Em suma, nossos resultados indicam a ROA é alcançada tanto com a utilização de fios de seda e algodão, no entanto, é mais precocemente estabelecida quando da utilização do fio de algodão.

A inflamação, avaliada unicamente pelos níveis gengivais de TNF- α , não refletem o aumento da ROA.

Os níveis de FAO indicam aumento dessa enzima em processos reabsortivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, T.; HAJISHENGALLIS, G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. **J Immunol Methods**, v. 394, n. 1, p. 49-54, 2013.
- AKKAOUI, J., *et al.* Contribution of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide to experimental periodontitis in relation to aging. **GeroScience** , v. 43, p. 367–376, 2021.
- AN, T., *et al.* Inhibition of experimental periodontitis by a monoclonal antibody against Porphyromonas gingivalis HA2. **Microb. Pathog.** V.154, 104633, 2021.
- ANTONINI, R., *et al.* Fisiopatologia da Doença Periodontal, v. 2, p. 90–107, 2013.
- BARON, R. Molecular mechanisms of bone resorption. An update,” **Acta Orthopaedica Scandinavica**, Supplement, v. 66, no. 266, p. 66–70, 1995.
- BEZERRA, M. M., *et al.* Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v.71, p. 1009-1014, June 2000.
- BONATO, C. F., *et al.* Hypertension favors the inflammatory process in rats with experimentally induced periodontitis. **J. Periodontal Res.** v. 47, p.783–792. doi: 10.1111/j.1600-0765. 2012. 01496.x. 2012.
- BRAUN, T.; SCHETT, G. Pathways for bone loss in inflammatory disease. **Curr. Osteoporos. Rep.**, v. 10, n. 2, p. 101-108, Jun. 2012.
- BRUZZANITI, A; BARON R. Molecular regulation of osteoclast activity. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 7, n. 1-2, p. 123–139, 2006.
- BUDUNELI, N., KINANE, D. F. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. **J. Clin. Periodontol.** v.38, (Suppl. 11), p. 85–105. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01670.x. 2011.
- BURR, D. B., ALLEN, M. R. **Basic and Applied Bone Biology**. 1st Edition, 2014.
- CANDEO, L.C., *et al.* Effects of periodontitis on the development of asthma: The role of photodynamic therapy. **PLoS ONE** 12(11): e0187945, 2017 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187945>
- CAO, G., *et al.* Local promotion of B10 function alleviates experimental periodontitis bone loss through antagonizing RANKL-expressing neutrophils. **J. Periodontol.**, v. 92, p. 907–920, 2021.
- CHEN, B., *et al.* RANKL expression in periodontal disease: where does RANKL come from? **Biomed Res Int**; v. 2014, 2014.

CHUNG, J. H., *et al.* Associations Between Periodontitis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease: The 2010 to 2012 Korean National Health and Nutrition Examination Survey. **J. Periodontol.**, v.87, p. 864–871, 2016.

COCHRAN, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **J Periodontol**, v.79, (8 Suppl), p. 1569–1576. <http://doi.org/10.1902/jop.2008.080233>. 2008.

CROTTI, T., *et al.* Receptor activator NF κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. **J Periodont Res**; v.38, p. 380–387, 2003.

CUNHA, F. Q., *et al.* Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 238, n. 1, p. 47-52, Jul. 1993.

DARVEAU, R. P. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. **Nat. Rev. Microbiol.** V.8, p. 481-90, 2010.

DE ALMEIDA, J.M., *et al.* Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy with acidic methylene blue for the treatment of experimental periodontitis. **PLoS ONE** 17(2): 2015 e0263103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263103>

DE LIMA, C. L., *et al.* Host-derived salivary biomarkers in diagnosing periodontal disease: systematic review and meta-analysis. **J. Clin. Periodontol.** v. 43, p. 492–502. doi: 10.1111/jcpe.12538, 2016.

DE MOLON, R. S., *et al.* Host responses induced by different animal models of periodontal disease: A literature review. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, v.4(4), p. 211–218, 2013.

DE MOLON, R.S., *et al.* Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. **J. Periodontol.**, v. 85, p. 465–477, 2014.

DE MOLON, R. S., *et al.* Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice. **Clinical Oral Investigations**, v. 20(6), p. 1203–1216, 2016.

DE MOLON, R. S., *et al.* Periodontal research contributions to basic sciences: from cell communication and host-parasite interactions to inflammation and bone biology. **Biocell**, v. 46, no. 3, p. 633–638, 2022.

DI BENEDETTO, A., *et al.* Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, 7 pages, 2013.

DOS SANTOS, V. R. N., *et al.* Açai (Euterpe oleracea Mart.) Attenuates Oxidative Stress and Alveolar Bone Damage in Experimental Periodontitis in Rats. **Antioxidants**, v. 11, p.1902, 2022. <https://doi.org/10.3390/antiox11101902>.

DYKE, T. E. V; BARTOLD, P. M; REYNOLDS, E. C. The Nexus between Periodontal Inflammation and Dysbiosis. **Front. Immunol.** V. 11, n. 511. doi:10.3389/fimmu.2020.00511, 2020.

ERTUGRUL, A. S., *et al.* Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis. **J. Periodont. Res.** V.48, p. 44–51. doi: 10.1111/j.1600-0765.2012.01500.x, 2013.

FAN, J., *et al.* Rabbit models for the study of human atherosclerosis: From pathophysiological mechanisms to translational medicine. **Pharmacol. Ther.**, v. 146, p.104–119, 2014.

FINE, N., *et al.* Periodontal Inflammation Primes the Systemic Innate Immune Response. **J. Dent. Res.**, v.100, p. 318–325, 2021.

FUJITA, Y., *et al.* Correlations between pentraxin 3 or cytokine levels in gingival crevicular fluid and clinical parameters of chronic periodontitis. **Odontology** v. 100, p. 215–221. doi: 10.1007/s10266-011-0042-1, 2012.

GARLET, G.P., *et al.* Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. **Oral Microbiol Immunol.** V. 21, p.12–20, 2006[PubMed: 16390336]

GOES, P *et al.* Loss of Dkk-1 in Osteocytes Mitigates Alveolar Bone Loss in Mice With Periodontitis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 2924 doi: 10.3389/fimmu.2019.02924Fr, December 2019.

GRAVES, D.T., *et al.* The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, v.35, p. 89–105, 2008.

GUIMARÃES, M. V., *et al.* Dry extract of *Matricaria recutita* L. (chamomile) prevents ligature-induced alveolar bone resorption in rats via inhibition of tumor necrosis factor- α and Interleukin- β . **J. Periodontol.**, v. 87, n. 6, p. 706-715, Jan. 2016.

HAIGH, B. J., *et al.* Alterations in the salivary proteome associated with periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 37, p. 241–247. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01525.x>

HAJISHENGALLIS, G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and host response. **Trends in Immunology**, v. 35, n. 1, p. 3–11. <http://doi.org/10.1016/j.it.2013.09.001>, 2014.

HAJISHENGALLIS, G., CHAVAKIS, T., LAMBRIS, J. D. Current understanding of periodontal disease pathogenesis and targets for host-modulation therapy. **Periodontol**, v. 84, no. 1, p. 14–34, 2000.

HAIJSHENGALLIS, G., LAMONT, R. J. Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. **Molecular Oral Microbiology**, v. 27, n.6, p. 409–419.

<http://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x>, 2012.

HAIJSHENGALLIS, G.; SAHINGUR, S.E. Novel inflammatory pathways in periodontitis. **Adv Dent Res**. V. 26 n.(1), p. 23–9, 2014.

HIENZ, S. A., PALIWAL, S., IVANOVSKI, S. Mechanisms of bone resorption in periodontitis. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, 2015.

<http://doi.org/10.1155/2015/615486>.

HUGOSON, A.; NORDERYD, O. Has the prevalence of periodontitis changed during the last 30 years? **Journal of Clinical Periodontology** v. 35 (Suppl. 8), p. 338–345, 2008.

HUGOSON, A., *et al.* Trends over 30 years, 1973–2003, in the prevalence and severity of periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v.35, p. 405–414, 2008.

ISHII, T., *et al.* Is Engaged in Both Pathogenic Bone Resorption and Retarded Bone Regeneration in a Ligature-Induced Mouse Model of Periodontitis. **Int. J. Mol. Sci.** v. 23, 5630, 2022.

KAJIYA, M., *et al.* Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. **J Oral Microbiol**. doi: 10.3402/jom.v2i0.5532., v.2, n. 5532, November 2010.

KASSEBAUM, N. J. *et al.* Global burden of severe periodontitis in 1990–2010: a systematic review and meta-regression. **J Dent Res**. V.93 (11), p. 1045–53, 2014.

KAYAL, R. A. The role of osteoimmunology in periodontal disease. **Biomed Res Int**. v. 2013, 12 pages, 2013.

KINANE, D. F., STATHOPOULOU, P. G., PAPAPANOU, P. N. Periodontal diseases. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 22, 17038. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>, 2017.

KIRST, M. E., *et al.* Dysbiosis and alterations in predicted functions of the subgingival microbiome in chronic periodontitis. **Applied and environmental microbiology**. V. 81, n. 2, p. 783-793, 2015.

KOHLI S. S., KOHLI V. S. Role of RANKL-RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications. **Indian J Endocrinol Metab**; v. 15, p.175-181, 2011.

KUBOTA, M., *et al.* The Effects of Cigarette Smoke Condensate and Nicotine on Periodontal Tissue in a Periodontitis Model Mouse. **PLoS ONE** , v. 11, e0155594, 2016.

- KUHR, A., *et al.* Observations on experimental marginal periodontitis in rats. **J Periodontal Res**, v. 39, n. 2, p. 101-106, 2004.
- KURGAN, S.; KANTARCI, A. Molecular basis for immunohistochemical and inflammatory changes during progression of gingivitis to periodontitis. **Periodontol 2000**; v.76(1) p.51–67, 2018.
- KURITA-OCHIAI, T., *et al.* Periodontal Disease-Induced Atherosclerosis and Oxidative Stress. **Antioxidants**, v. 4, p. 577–590, 2015.
- LERNER, U. H. New Molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption, **Crit Rev Oral Biol Med** v.15, n. 2, p. 64–81, 2004.
- LIMA, V., *et al.* Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. Eur. **J. Oral Sci.**, v. 108, n. 2, p. 123-129, Apr. 2000.
- LIMA, V., *et al.* Effects of tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. **J. Periodontol.**, v. 75, n. 1, p. 162-168, Jan. 2004.
- LIU, C., *et al.* The Role of Reactive Oxygen Species and Autophagy in Periodontitis and Their Potential Linkage. **Front. Physiol.**, v. 8, 439, 2017.
- LIU, M *et al.* Ability of S100 proteins and matrix metalloproteinase-9 to identify periodontitis in a ligature-induced periodontitis dog model. **J Clin Periodontol.** ; v. 47, p. 182–192, 2019.
- LORENZO, J., *et al.* Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems. **Journal of Chemical Information and Modeling** v. 53, 2015.
- MARCHESAN, J., *et al.* An experimental murine model to study Periodontitis. **Nature Protocols**. V. 13, p. 2247–2267, october 2018.
- MOSS, D.W; WHITBY, L.G. A simplified heat-inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. **Clin Chim Acta** v. 61, p. 63-71, 1975.
- NAKASHIMA, T.; HAYASHI, M.; TAKAYANAGI, H. New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms. **Trends Endocrinol. Metab.** V. 23, p. 582–590, 2012.
- NAZIR, M. A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. **International Journal of Health Science**, v. 11, p. 72–80, 2017.
- NEWMAN, M. G., *et al.* Carranza's Clinical Periodontology, **Elsevier Saunders**, St. Louis, Mo, USA, 11th edition, 2015.

NIZET, A., *et al.* Bone alkaline phosphatase: An important biomarker in chronic kidney disease – mineral and bone disorder. **Clinica Chimica Acta** v. 501, p. 198-206, February 2020.

OATES, T. W.; COCHRAN, D. L. Bone cell interactions and regulation by inflammatory mediators. **Current Opinion in Periodontology**, v. 3, p. 34–44, 1996.

OHNISHI, T., *et al.* Involvement of Cot/Tp12 in Bone Loss during Periodontitis. **J. Dent. Res.**, v. 89, p.192–197, 2010.

OLIVEIRA, S. H. P., *et al.* Aliskiren Attenuates the Inflammatory Response and Wound Healing Process in Diabetic Mice With Periodontal Disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. 708, July 2019.

OZ, H.S.; PULEO, D.A. Animal Models for Periodontal Disease. **J Biomed Biotechno;** 2011:754857, 2011.

PACIFICI, R. The immune system and bone. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 503, n. 1, p. 41-53, Nov. 2010.

PAGE, R. C.; KORNMAN, K. S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontol.** 2000, v. 14, p. 9-11, Jun. 1997.

PAPANAOU, P. N.; WENNSTROM, J. L. A 10 year retrospective study of periodontal disease progression. Clinical characteristics of subjects with pronounced and minimal disease development. **Journal of Clinical Periodontology** v. 17, p. 78–84, 1990.

PEREIRA, S. S. C., *et al.* An alternative, easy and reproducible method of stabilization and ligature-induced periodontitis in mouse. **MethodsX** , v. 17, n.6, p. 2156–2165, 2019.

PIHLSTROM, B. L., MICHALOWICZ, B. S., JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **Lancet** v. 366, p.1809-1820, 2005.

PIRIH, F. Q., *et al.* Ligature-induced peri-implantitis in mice. **Journal of Periodontal Research**, v. 50(4), p. 519–524, 2015.

POUROVÁ, J., *et al.* Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. **Acta Physiol.**, v. 198, p. 15–35, 2010.

QI, W., *et al.* TLR4 gene in the regulation of periodontitis and its molecular mechanism. **Exp. Ther. Med.**, v. 18, p. 1961–1966, 2019.

RATHNAYAKE, N, *et al.* Salivary biomarkers of oral health: a cross-sectional study. **J. Clin. Periodontol.** v. 40, p. 140–147. doi: 10.1111/jcpe.12038, 2013.

ROJAS, C., *et al.* Humanized Mouse Models for the Study of Periodontitis: An Opportunity to Elucidate Unresolved Aspects of Its Immunopathogenesis and Analyze New Immunotherapeutic Strategies. **Front. Immunol.** , v. 12, 663328, 2021.

SAFFAR, J. L; LASFARGUES, J. J; CHERRUAU, M. “Alveolar bone and the alveolar process: the socket that is never stable,” **Periodontology 2000**, v. 14, n. 1, p. 76–90, 1997.

SAFIEH-GARABEDIAN, B., *et al.* Contribution of interleukin-1 β to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 115, p. 1265– 1275, 1995.

SCHWARTZ, Z., *et al.* Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 14, no. 1, p. 158–172, 1997.

SKUDUTYTE-RYSSTAD, R., ERIKSEN, H. M. & HANSEN, B. F. Trends in periodontal health among 35-year-olds in Oslo, 1973–2003. **Journal of Clinical Periodontology** v. 34, p. 867–872, 2007.

TAKAYANAGI, H., *et al.* Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. **Dev. Cell**, v. 3, n. 6, p. 889-901, Dec. 2002.

TAKAYANAGI, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 4, p. 292-304, Apr. 2007.

TARIQ, M., *et al.*, Treatment modalities and evaluation models for periodontitis, **Int J Pharm Investig**; v. 2, n. 3, p. 106–122, 2012.

TAT S. T., *et al.* New perspective in osteoarthritis: the OPG and RANKL system as a potential therapeutic target? **Keio J Med**; v. 58, p. 29-40, mar 2009.

TEITELBAUM, S. L. Bone resorption by osteoclasts. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1504–1508, 2000.

TEITELBAUM, S. L. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 2, p. 427–435, 2007.

TENG, Y. T., *et al.* Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 106, p. 59–67, 2000.

TENG, Y. T. A. Mixed Periodontal Th1-Th2 Cytokine Profile in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-Specific Osteoprotegerin Ligand (or RANK-L)- Mediated Alveolar Bone Destruction In Vivo. **Infection and immunity**, v. 70, n.9, p. 5269–5273, Sept. 2002.

- TENG, Y. T., SODEK, J., MCCULLOCH, C. A. Gingival crevicular fluid gelatinase and its relationship to periodontal disease in human subjects. **Journal of Periodontal Research**, v. 27, p. 544–552. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1992.tb01830.x>
- TOMINA, D. C., *et al.* Comparative Testing of Two Ligature-Induced Periodontitis Models in Rats: A Clinical, Histological and Biochemical Study. **Biology**, v. 11, 634, 2022
<https://doi.org/10.3390/biology11050634>
- TSUDA, E. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 234, p. 137-142, 1997.
- TSUKASAKI, M., *et al.* Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells, **Nat. Commun.** v. 9 (1), 701, 2018.
- TSUKASAKI, M.; TAKAYANAGI, H. Osteoimmunology: Evolving concepts in bone-immune interactions in health and disease. **Nat. Rev. Immunol.** V. 19, p. 626–642, 2019.
- VIGNERY, A; BARON, R. Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodeling in the adult rat. **The Anatomical Record.**; v. 196, n. 2, p. 191–200. <https://doi.org/10.1002/ar.1091960210>, 1980.
- XU, F., TEITELBAUM, S. L. Osteoclasts: New Insights. **Bone Research**, v.1, n. 1, p. 11–26. <http://doi.org/10.4248/BR201301003>, 2013.
- WANG, G. P. Defining functional signatures of dysbiosis in periodontitis progression. **Genome Medicine**, v. 7, n. 40. <http://doi.org/10.1186/s13073-015-0165->, 2015.
- WARA-ASWAPATI, N., *et al.* RANKL Upregulation Associated With Periodontitis and Porphyromonas gingivalis. **J Periodontol**, v. 78, n. 6, p. 1062-1069, June 2007.
- WENNSTROM, J. L., *et al.* Periodontal conditions of adult regular dental care attendants. A 12 year longitudinal study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 20, p. 714–722. 1993 doi: 10.1111/j.1600-051X.1993.tb00696.x.
- WIEBE, S. H., *et al.* Osteoclast activation in inflammatory periodontal diseases. **Oral Diseases**, v. 2, n. 2, p. 167–180, 1996.
- YUCEL-LINDBERG, T.; BÅGE, T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. **Expert. Rev. Mol. Med.**, v. 15 Aug. 2013.