UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DE TLR-2 NO DESENVOLVIMENTO DA
RESPOSTA IMUNE APÓS A INFECÇÃO COM
Aggregatibacter actinomycetemcomitans.**

VALÉRIA GELANI

Bauru - SP

2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DE TLR-2 NO DESENVOLVIMENTO DA
RESPOSTA IMUNE APÓS A INFECÇÃO COM
Aggregatibacter actinomycetemcomitans.**

**Dissertação apresentada a Faculdade de
Odontologia de Bauru, da Universidade de
São Paulo, como parte dos requisitos
necessários para obtenção do título de
MESTRE em Odontologia, área de
Estomatologia e Biologia Oral.**

Aluno: Valéria Gelani

Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Campanelli

Bauru - SP

2007

Gelani, Valéria

G28c Caracterização do papel de TLR2 no desenvolvimento da resposta imune após a infecção com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.-- Bauru, 2007.

xxxii, 86p. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Campanelli

Autorizo, exclusivamente pra fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e/ou meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data:

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB-USP: projeto de pesquisa aprovado em 23 de novembro de 2006.

Número do protocolo: 23/2006

Valéria Gelani

Dados Curriculares

30 de março de 1974	Nascimento
São Paulo/SP	
Filiação	Waldomiro Gelani Rosa Maria Rodrigues Gelani
1993 - 1997	Graduação em Odontologia na Faculdade de Odontologia de Marília / UNIMAR
2000 – 2002	Especialização em Endodontia, Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, HRAC-USP, São Paulo
2002-2003	Aperfeiçoamento em Periodontia, Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, HRAC-USP, São Paulo
2006-2007	Especialização em Microbiologia Clínica, Faculdades Integradas de Bauru, FIB, São Paulo
2005 - atual	Mestrado em Estomatologia e Biologia Oral, Área de Concentração Biologia Oral na Faculdade de Odontologia de Bauru / Universidade de São Paulo

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia e Micorbiologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo.

Apoio: FAPESP

Dedicatória

Dedicatória

A nosso Senhor, que me deu a oportunidade de chegar até aqui e que me abençoou com a presença de pessoas a quem dedico este trabalho.

Meus pais Rosa e Waldomiro que participaram de todas as minhas escolhas, me apoiando e me orientando. Pais amigos e cúmplices, defensores incondicionais, Pessoas exemplares em dignidade, perseverança e honestidade. A base de uma família que lhes deve a vida e os ensinamentos sobre o sentido de amar. Nunca terei como lhes agradecer. Só posso agradecer a Deus todos os dias por vocês estarem presentes na minha vida

À minha doce e amada irmã Fabiana e meu cunhado Levi. Pessoas cuja alegria e incentivo transpassam o significado de amizade. A quem devo muitas risadas e “boas férias“, a quem apesar da distância vejo perfeitamente todos os dias ao meu lado. Muito obrigada!

Ao meu amado marido Wilson, que Deus colocou ao meu lado há alguns anos, mas que parecem poucos dias, tamanha a felicidade, cumplicidade e amizade que dividimos. Agradeço por sua paciência, seu colo, seu amor e minha vida! Agradeço por lutar comigo por meus objetivos.

Meu amado amigo, muito obrigada por dividir comigo sua vida. Te amo!

Agradeço ainda a Professora Dra. Ana Paula Campanelli. Idealizadora desse trabalho. Minha Mestre, que teve a paciência de entender minhas dúvidas científicas e humanas, que soube me resgatar em momentos difíceis, que soube me fazer rir. Que me deu colo quando nem eu aceitava meus erros, mas me trouxe para um mundo que nunca imaginei fazer parte. Obrigada pela sua presença e por me dar a honra de desenvolver a sua idéia. Muito obrigada!

Agradecimentos

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. João Santana da Silva** colaborador indireto deste trabalho, pois graças a ele conseguimos obter os animais deficientes de TLR2.

Ao **Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet e Vanessa Soares Lara** que direta ou indiretamente auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho, sempre me recebendo e abrindo as portas de suas salas para me ajudar.

Ao **Professor Dr. Sérgio Aparecido Torres**, muito obrigada pelas incríveis conversas e risadas, pela discussão de dúvidas, a atenção e carinho com que sempre me tratou.

Ao **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos** por todo o aprendizado, além do exemplo de disposição e perseverança.

Ao **Prof. Flávio Augusto Cardoso de Farias** pelo exemplo de vida e dedicação ao ensino. Pelas conversas e conselhos, por me orientar no PAE e nas minhas expectativas. Meu grande exemplo de Professor. Muito obrigada por ter dividido comigo seu conhecimento.

À **Profa. Dra. Ana Lúcia Fraga**, minha orientadora de aperfeiçoamento de Periodontia, que passou de orientadora a amiga e confidente. Um exemplo de luta e dedicação. Um porto seguro em qualquer situação da minha vida.

Aos profissionais do Biotério FOB-USP: **Luiz, Erasmo, Elias e Richard** que aceitaram, junto à Profa. Dra Ana Paula Campanelli o desafio de manter a criação de animais isogênicos nesta Faculdade, e ao responsável técnico pelo Biotério de Animais Isogênicos da USP-Ribeirão Preto Sr Júlio que disponibilizou os animais nocautes.

À minha querida sobrinha **Júlia**, meu cunhado **Marcelo, Dirce e Sr. Wilson**, muito obrigada pela atenção e carinho.

À **Nancy e Pedro**, meus padrinhos que sempre me incentivaram e lutaram comigo por meus sonhos.

À toda **Família Rodrigues**, exemplos de luta e alegria

Aos meus amigos de Trabalho, **Rodrigo, Ronan, Marcela, Carla, Tati Sales, Victor, Ana Paula, Vanessa, Hayana, Angel (Carla Sipert) e Eduardo “Noel”**, pessoas que me ensinaram que a diferença seria a maior soma da minha vida. Pessoas queridas, humanas que compartilharam minhas dificuldades, dúvidas, realizações e alegrias. Agradeço pelo convívio pela alegria nas horas de trabalho, pela honestidade, e confiança. Agradeço pela amizade e carinho com que sempre me trataram.

À **Thais e Ana Lúcia Gasparotto**. Amigas de todas as horas, das viagens e trabalhos. Agradeço pela ajuda científica que a Thaís sempre me deu, independente da hora ou do lugar onde a dúvida surgia, por sua amizade, por seu colo, seus almoços. Amizades que ganhei de presente de Deus e que me salvou em várias situações, muito obrigada!

André, Claudia, Dalva por toda dedicação e profissionalismo

Aos amigos encontrados em outros departamentos e cujo auxílio técnico foi imprescindível para a realização deste trabalho: **Dani, Bruno, Tânia, Ovídio, Telma, Thiago, Vera, Fatiminha, Cris**.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia de Ribeirão Preto, em especial, **Luciano Panaggio, Alessandra e Cristina** pelo apóio e auxílio prestado;

Aos meus amigos de Centrinho: **Thaís Accorsi, Lidianne Castro, Mauro Corotti, André Sakima, Leandro, Luiz e Samuel** que compartilharam comigo momentos de suas vidas e com quem dividi minhas experiências. Amigos com os quais aprendi muito e pude contar durante minha passagem pelo Hospital.

Aos colegas: **Simone, Érica (Bariri), Patrícia, Janaína e Kadu** pelo respeito com que sempre me trataram.

Aos amigos profissionais **Maurício, Ana, Luiz Eduardo, Henrique e Dani** pela paciência e incentivo.

Aos amigos do HRAC-USP, ***Celso Kenji Nishiana e Renata Pardini Hussne***. Meus primeiros orientadores e incentivadores. Vocês são os responsáveis por despertar minha curiosidade científica e espírito de trabalho em grupo. À querida ***Edininha***, pela proteção e cuidados dispensados durante minha especialização.

E....

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Resumo

Os tecidos periodontais estão em confronto contínuo com microrganismos capazes de disparar mecanismos da resposta imune inata, dando origem ao infiltrado inflamatório neutrofílico. A participação dos receptores tipo Toll (TLRs) na resposta de neutrófilos frente à periodontopatógenos associados à doença periodontal precisam ser determinados. Nesse estudo procuramos caracterizar o infiltrado inflamatório presente no peritônio de animais deficientes de TLR2^{-/-}, avaliar a atividade fagocítica, bem como a produção de óxido nítrico (NO) e a atividade de mieloperoxidase (MPO) no curso da infecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). Os resultados revelaram um menor recrutamento de leucócitos para o peritônio de animais deficientes de TLR2 (TLR2^{-/-}), com predomínio de macrófagos no exsudato peritoneal tanto de animais selvagens (WT_{TLR2}^{-/-}) como nos animais nocautes. A análise da atividade fagocítica revelou uma menor taxa de fagocitose pelas células do exsudato de animais TLR2^{-/-} e, ainda, a deficiência do receptor TLR2 inibiu a produção de NO (óxido nítrico) e atividade de MPO (mieloperoxidase). Adicionalmente, são apresentados os resultados referentes ao protocolo de doença periodontal experimentalmente induzida (DPEI) com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) em camundongos deficientes de TLR2. Os resultados mostraram que 100% dos animais deficientes de TLR2 sobreviveram à infecção durante o período de observação. Em relação à análise de perda óssea os dados revelaram uma maior perda progressiva de osso alveolar na região dos molares de animais deficientes de TLR2. A ausência do receptor interferiu com a disseminação da bactéria, uma vez que se observou um grande número de bacilos no linfonodo e baço dos animais que não expressaram TLR2, diferente do observado para os animais selvagens (WT_{TLR2}^{-/-}). Os resultados indicam a importância da sinalização via TLR2 durante a resposta imune contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Palavras chaves: Neutrófilos, Doença Periodontal; Receptores do tipo Toll.

Abstract

TLR2 signaling is critical for immune protection against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infections.

Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) are the first line of defense against bacterial infections. PMNs express a numerous pattern-recognition receptors (PRR) that facilitate identification of invading microorganisms. Toll-like receptors (TLRs) represent the main class of PRR involved to a recognize pathogenic microorganism. However, the role played by TLR-2 in the recognition and killing of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* by PMNs is unknown. Thus, we investigated the ability of TLR-2 to mediate neutrophil phagocytosis and bactericidal activity. To determine the role of *A. actinomycetemcomitans* in triggering neutrophil infiltration, TLR2^{-/-} mice were infected intraperitoneally (2x10⁹ bacteria) and sacrificed after 24 hours. Peritoneal inflammatory cells were isolated and analyzed by optical microscopy. Examination of local inflammatory infiltrates revealed that neutrophil influx into peritoneal cavity of TLR2^{-/-} mice was similar than that observed into their littermate controls wild type C57BL/6 mice (WT). *A. actinomycetemcomitans* was detected in the spleen of the TLR2^{-/-} mice but not in WT. In the phagocytic assays, TLR2^{-/-} presented minor number of ingested inflammatory cells than WT. Peritoneal cells were stimulated with *A. actinomycetemcomitans* antigens, and NO and myeloperoxidase was measured after 48 hours; results showed that TLR2^{-/-} cells produce less NO and MPO than WT. In addition, TLR2^{-/-} deficient mice presented higher bone loss following oral infection with *A. actinomycetemcomitans* when compared with WT and higher tissue destruction.

Keyword: neutrophils, Periodontal Disease; TLR2

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs.....	células apresentadoras de antígeno
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Aa	<i>Aggreagtibacter actinomycetemcomitans</i>
BPI.....	proteína bactericida de permeabilidade aumentada
bNOS.....	óxido nítrico sintase neuronal
CXCL-8.....	quimiocina análoga a IL-8
CD14.....	receptor necessário para ativação de macrófago induzida por LPS
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CFU/UFC.....	unidade formadora de colônia
COA.....	crista óssea alveolar
DP.....	Doença periodontal
DNA.....	ácido desoxirribonucléico
eNOS.....	óxido nítrico sintase endotelial
FITC.....	Iotiocianato de fluoresceína
FC.....	Porção constante do anticorpo
g.....	giros
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HOCl.....	ácido hipocloroso
iNOS.....	óxido nítrico induzível
IL-1.....	interleucina-1
IL-.....	interleucina -
IFN- γ	interferon- γ

JAC.....junção amelo-cementária

KDa.....quilodalton

LL-37.....Catelicidina

LPS.....lipopolissacarídeo

LRR.....seqüências ricas em leucinas

Ilx.....leucotoxina

MMP8metaloproteinase 8

MMP9metaloproteinase 9

MMP25.....metaloproteinase 25

MPO.....mieloperoxidase

MyD88.....fator de diferenciação mieloide, proteína adaptadora na transdução de sinal do receptor TLR

MALT.....ativador transcricional

MS.....mitis salivaris agar

MAS.....Staphylococcus manitol salt

M.....molar

NADPH.....dinucleotídio adenina dinucleotídio fosfato

Omps.....proteína externa de membrana

PCR.....reação de cadeia da polimerase

PAL.....periodontite agressiva localizada

PAMPs.....padrões moleculares associados a patógenos

PMNs.....polimorfonucleares

ROIS.....intermediários reativos de oxigênio

RNA.....ácido ribonucléico

Sb.....Sabouraud Dextrose agar

STAT-1.....transdutor de sinal

TNF- α fator de necrose tumoral – α

TLR.....receptor do tipo toll (toll like receptor)

TIR.....domínio homólogo (toll-like/IL-1)

TIRAP.....ativador transcripcional

TSA.....trypic soy agar

TLR2^{-/-}deficiente para receptor TLR2

TGF- βfator de crescimento tumoral- β

WT.....wild type/ selvagem

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO.....	1
II.	PROPOSIÇÃO.....	19
III.	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
	1. Cultura de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	23
	2. Marcação de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	23
	3. Animais de experimentação	24
	4. Infecção intraperitoneal dos animais	24
	5. Avaliação do recrutamento de neutrófilos	25
	6. Cultivo de células	25
	7. Ensaio de fagocitose	25
	8. Atividade de mieloperoxidase	26
	9. Avaliação da produção de óxido nítrico	26
	10. Disseminação de <i>A. actinomycetemcomitans</i> após infecção peritoneal	27
	11. Doença periodontal experimental induzida	27
	12. Coleta das amostras	28
	13. Isolamento de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	29
	14. Extração de DNA bacteriano.....	30
	15. Avaliação da reabsorção óssea	31
	16. Análise histológica.....	32
	17. Análise estatística.....	32
IV.	RESULTADOS.....	36
	1. A ausência de TLR2 não interfere com a sobrevivência de camundongos C57BL/6 após a infecção peritoneal com <i>A. actinomycetemcomitans</i>	37
	2. A ausência de TLR2 leva a um menor recrutamento de leucócitos após a infecção peritoneal com <i>A. actinomycetemcomitans</i>	37
	3. Células inflamatórias de animais deficientes de TLR2 apresentam menor atividade fagocítica após estímulo com Aa	39
	4. A ausência de TLR2 leva a uma menor atividade de mieloperoxidase após a infecção com Aa	42
	5. Células de camundongos deficientes de TLR2 apresentam menor produção de óxido nítrico após estimulação com antígeno de Aa	42

6. Camundongos deficientes de TLR2 apresentam uma alta taxa de disseminação de Aa.....	44
7. Análise da sobrevivência de animais C57BL/6 e deficientes de TLR2 ^{-/-} após indução de doença periodontal	44
8. Diversidade microbiológica oral dos animais C57BL/6 e TLR2 ^{-/-} antes e após indução da doença periodontal	47
9. Avaliação da perda óssea	50
10. Análise histopatológica de tecido gengival de animais submetidos à doença periodontal	50
11. Efeitos sistêmicos da infecção oral por Aa durante o curso da doença periodontal experimental	53
12. Disseminação de Aa após a indução da doença periodontal	54
V DISCUSSÃO.....	60
VI CONCLUSÕES.....	70
VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

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

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

Mesmo que tal resposta supostamente proteja o hospedeiro da invasão microbiana, a relativa inacessibilidade dos leucócitos e de fatores antimicrobianos aos microrganismos no sulco gengival, somada à proteção conferida por sua organização

na forma de biofilme, inviabilizam a eliminação dos agentes infecciosos (Ebersole e Taubman, 1994; Page, 1998; Ebersole *et al.*, 2001; Socransky e Haffajee, 2002; Sbordone e Bortolaia, 2003).

A forma mais prevalente destas doenças é a gengivite, que se caracteriza por alterações inflamatórias limitadas ao periodonto de proteção, sendo clinicamente representada por mudanças de contorno, edema e vermelhidão do tecido gengival, assim como sangramento espontâneo ou à sondagem. No entanto, a gengivite limita-se aos tecidos moles adjacentes ao dente, não alcançando áreas mais profundas do periodonto, como o osso alveolar, com isso a remoção do biofilme dentobacteriano e, conseqüentemente, o agente agressor, favorece a resolução da doença sem gerar seqüelas para o paciente (Lehner *et al.*, 1974; Page e Schroeder, 1976; Armitage, 1999; Albandar, 2002).

Outra manifestação das doenças periodontais é a periodontite. Além das alterações inflamatórias presentes na gengivite, a característica marcante desta doença é a destruição de tecido periodontal de suporte (osso alveolar, inserção conjuntiva e ligamento periodontal) que, em casos mais avançados, pode levar à perda da função e do elemento dentário. Entretanto, mesmo após a remoção do agente agressor, seqüelas causadas por essa doença somente serão corrigidas por procedimentos cirúrgicos regenerativos.

Vários trabalhos têm demonstrado que a gengivite antecede a periodontite (Saxe *et al.*, 1967; Page e Schroeder, 1981; Lindhe *et al.*, 1985; Kornman *et al.*, 1997; Albandar, 2002) e, como mencionado anteriormente, a presença de microrganismos patogênicos no biofilme é necessária para a iniciação e a progressão das doenças periodontais (Albandar, 2002).

As doenças periodontais diferem da maioria das outras infecções por não serem causadas por uma única bactéria, mas por um grupo de bactérias. Embora mais de 500 espécies bacterianas possam ser isoladas da cavidade oral, apenas uma pequena fração tem potencial para causar a destruição óssea periodontal. Entre as espécies mais relacionadas com esse quadro estão *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* (Ooshima *et al.*, 2003; Tietze *et al.*, 2006; Sakai *et al.*, 2007). Muitos microrganismos, em particular as espécies *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, possuem a capacidade de invadir os tecidos periodontais e estabelecer uma infecção (Schenkein, 2006). A microbiota relacionada com as doenças periodontais induz uma resposta imunológica altamente complexa e multifatorial, cujos componentes celulares desempenham um papel direto contra os microrganismos (Genco, 1992; Madianos *et al.*, 2005; Tietze *et al.*, 2006).

Durante o desenvolvimento da resposta imune no periodonto, as primeiras células a entrarem em contato com os microrganismos são as células epiteliais que compõem o epitélio juncional, o epitélio do sulco e o epitélio oral. Estas atuam como barreira física impedindo a invasão do microrganismo e secretam uma gama de peptídeos antimicrobianos, como β -defensinas e catelicidina (LL-37) (Marshall, 2004; Dale e Fredericks, 2005). As células epiteliais, após a interação com o agente agressor, têm um papel importante no desenvolvimento da resposta imune por produzirem CXCL8 (IL-8), uma quimiocina que dirige a migração de neutrófilos para o sítio da infecção (Yoshimura *et al.*, 1987; Silva *et al.*, 2007). De fato, os leucócitos polimorfonucleares (PMN) são as primeiras células a migrarem em direção ao foco inflamatório, compondo a primeira linha de defesa do hospedeiro contra a infecção microbiana.

Porém, pouco se conhece a respeito da importância individual de cada população celular na imunopatogênese e progressão da doença periodontal, muito menos é conhecido sobre os fatores que desencadeiam a migração, permanência e ativação de tais células no tecido gengival.

Neutrófilos polimorfonucleares estão presentes nos tecidos periodontais mesmo em condições clínicas de saúde, são a população celular predominante no início da reação inflamatória e ainda podem ser encontrados em lesões estabelecidas (Sttstrom, 1975). O papel protetor dos neutrófilos nos tecidos periodontais é bem evidenciado nas síndromes que apresentam disfunções dos leucócitos polimorfonucleares. Pacientes portadores de doenças como neutropenia crônica ou cíclica sofrem frequentemente de formas severas e precoces de periodontite (Schenkein, 2006)

Os neutrófilos compreendem aproximadamente dois terços dos leucócitos do sangue periférico. Na invasão microbiana, ocorre uma rápida migração destas células do sangue para o tecido, limitando a proliferação de microrganismos (Zhang *et al*, 2004) No sítio da infecção, os neutrófilos liberam mediadores inflamatórios e produtos antimicrobianos que permitem o recrutamento e a ativação de outras células do sistema imune (Tabuko, 1997). Assim, os neutrófilos desenvolvem um papel essencial na imunidade inata contra agentes infecciosos, fornecendo a defesa imediata após o encontro com o microrganismo. Porém, a ativação excessiva ou inapropriada dos neutrófilos pode resultar em forte inflamação e danos severos ao tecido do hospedeiro, contribuindo para a patologia de uma variedade de doenças não infecciosas, tais como a artrite reumatóide, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica e síndrome respiratória aguda (Attstrom, 1975; del Fabbro *et al.*, 2000; Waddington *et al.*, 2000, Cook *et al*, 2004; Sabroe *et al*, 2002).

Além da atividade fagocítica, os neutrófilos são capazes de produzir inúmeros agentes antimicrobianos, que permanecem armazenados em seus grânulos primários ou azurófilos sendo a elastase, catepsina G, protease 3, azurocidina e mieloperoxidase os fatores mais relevantes; em seus grânulos secundários (específicos) e terciários a lactoferrina, lipocalina, lisozima, MMP8, MMP9 e MMP25 são os agentes antimicrobianos mais relevantes (Nathan, 2006). Essas células promovem uma redução não mitocondrial do oxigênio para formar intermediários reativos de oxigênio (ROIs) que incluem anião superóxido, oxigênio singlete, ozônio, peróxido de hidrogênio, cloraminas e radicais hidroxila que também representam importantes produtos microbicidas dos neutrófilos. Assim, após a ingestão de microrganismos patogênicos, inúmeros mecanismos podem ser desencadeados no interior dos neutrófilos para a morte do agente agressor. O mecanismo oxigênio-independente inclui a liberação de peptídeos e proteínas dos grânulos como proteína bactericida de permeabilidade aumentada (BPI), defensinas e catelinas. São proteínas catiônicas e a carga positiva, provavelmente, medeia a ligação inicial ao microrganismo, visto que na maioria das vezes as estruturas da superfície bacteriana são aniônicas (Brinkmann, 2007). Nos mecanismos oxigênio-dependentes, os neutrófilos ativados sofrem uma explosão de consumo de oxigênio, que é convertido por NADPH-oxidase ligada à membrana em ânion superóxido, um precursor para várias espécies reativas de oxigênio, especialmente peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A mieloperoxidase usa H_2O_2 e ubiquitina íons cloreto para gerar ácido hipocloroso (HOCl), um oxidante altamente tóxico (Belaouaj, 2002).

A mieloperoxidase (MPO) é produzida no estágio pré-mielócito e armazenada nos grânulos primários de neutrófilos. No foco da infecção, a MPO é liberada nos fagossomos e, junto com a elastase, participa da degradação da bactéria. A MPO contribui na defesa do hospedeiro e também é capaz de limitar oxidativamente a

elastase, controlando assim possíveis danos teciduais provocados pela liberação da elastase (Belaouaj, 2002). Enzimas que inativam o peróxido de hidrogênio, como a catalase produzida por *A. actinomycetemcomitans*, protegem o microrganismo da ação microbida do peróxido de hidrogênio e, conseqüentemente, da ação microbida dos neutrófilos (Mandell, 1975). A presença de MPO em tecidos periodontais doentes tem sido relatada em diversos estudos, mas normalmente investigada como um marcador do nível de inflamação local (Yamalik *et al.* 2000, Liskmann *et al.* 2004).

Como um componente chave da resposta imune inata, os neutrófilos são importantes no recrutamento e ativação das células apresentadoras de antígeno (APCs), gerando sinais quimiotáticos que atraem monócitos para o foco da infecção.

Os macrófagos são encontrados em números substanciais na periodontite crônica. Eles reagem com componentes bacterianos, particularmente lipopolissacarídeo (LPS), e são ativados para liberar seus mediadores inflamatórios e citocinas nos tecidos circundantes. Também podem apresentar papel regulatório da resposta imune local através da fagocitose e morte de patógenos, seguida pela apresentação de antígenos. Especula-se que uma possível falha na ativação dos macrófagos nas doenças periodontais (Lappin *et al.*, 1995; Seymour, 1983) poderia influenciar o perfil de ativação das células T durante o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva. Macrófagos são células multifuncionais; possuem atividade fagocitária, apresentam capacidade de secretar uma série de produtos moleculares bem definidos, biologicamente ativos (Adams, 1984; Nathan, 1980), estão envolvidas no processamento e apresentação de antígenos a linfócitos T (Pierce, 1980; Rosenthal, 1980) e contribuem para a regulação da resposta imune específica (Doherty, 1995). A capacidade de fagocitar e digerir materiais estranhos é uma de suas primeiras atividades

e estes processos têm sido extensivamente estudados *in vitro* (Stossel, 1974, Stossel, 1975).

O principal mediador antimicrobiano produzido pelos macrófagos é o óxido nítrico (NO) (Bogdan, 2001). O NO é um radical livre produzido a partir do aminoácido L-arginina através da ação de isoenzimas, globalmente denominadas NO sintases (NOS). Três diferentes isoformas são conhecidas: NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (bNOS) e NOS induzível (iNOS). A eNOS e bNOS são constitutivas ou basais (cNOS) e produzem baixas concentrações de NO por um curto período de tempo. Contudo, a iNOS, identificada em vários tipos celulares como macrófagos e PMNs, é expressa em resposta a estímulos inflamatórios, tais como IL-1, TNF- α , IFN- γ e LPS, sendo produzida em altas quantidades e por longo período de tempo (Bogdan, 2001). Quando o NO é localmente produzido em altas concentrações, pode agir como molécula citotóxica ou citostática contra células infectadas por fungos, bactérias, protozoários, bem como células tumorais e células próximas à região de produção de NO, podendo resultar em extensa destruição tecidual.

A expressão da enzima iNOS e a produção de NO se encontram elevadas no periodonto em estado de doença (Matejka *et al.*, 1998, Lappin *et al.*, 2000, Hirose *et al.*, 2001, Batista *et al.*, 2002). No microambiente da doença periodontal, a presença de estímulos inflamatórios capazes de induzir a produção de NO por células inflamatórias é bem estabelecida (Walh, 1988; Hirose, 2001; Yanagita, 2002). A presença de altas quantidades de L-arginina e L-citrulina em tecido gengival inflamado e a expressão de iNOS em macrófagos e PMNs em periodontites induzidas experimentalmente em ratos, bem como em fibroblastos, células epiteliais, macrófagos e células endoteliais em periodontite humana, revelam a possível participação do NO na doença periodontal.

Estudos também demonstram que LPS de bactérias periodontopatogênicas tem a capacidade de estimular a síntese de NO em células humanas e murinas (Blix *et al.*, 1998), e que a ausência de iNOS leva ao aumento na suscetibilidade à infecção por *P. gingivalis* em um modelo de infecção em câmara subcutânea em camundongos (Gyurko *et al.*, 2003). Adicionalmente, a capacidade dos PMNs humanos de expressar iNOS, bem como sintetizar e secretar NO, foi evidenciada *in vivo* e *in vitro* a partir de amostras de lesões periapicais inflamatórias crônicas e de exsudatos inflamatórios coletados de sítios com reabsorção óssea e inflamação crônica.

Todos os eventos descritos acima são desencadeados após o reconhecimento do patógeno. O reconhecimento inicial de microrganismos é mediado por receptores celulares expressos em células da imunidade inata. A interação entre moléculas de superfície do patógeno e receptores homólogos presentes na membrana celular de neutrófilos e macrófagos modulam a fagocitose e a ativação celular (Haslett *et al.*, 1994; Gamonal & Bascones, 2001). Monócitos, macrófagos e neutrófilos são células da imunidade inata que expressam receptores de superfície para manose, componentes do sistema complemento, porção Fc de moléculas de imunoglobulinas e receptores semelhantes à Toll (TLR, *Toll-like receptor*) capazes de reconhecer produtos microbianos. A ativação celular via esses receptores leva à estimulação da fagocitose, atividade microbicida e produção de citocinas (Green *et al.*, 1981). A capacidade das células da imunidade inata em reconhecer uma diversidade de produtos microbianos está associada à produção de padrões distintos de citocinas frente à estimulação por diferentes microrganismos (Springer *et al.*, 1994). Entretanto, a doença periodontal difere de outras infecções por não ser causada por uma única espécie bacteriana, mas por um conjunto de bactérias, composto tanto por bactérias Gram-negativas quanto

Gram-positivas, o que poderia influenciar o perfil de ativação de macrófagos e neutrófilos e, conseqüentemente, a resposta imune inata gerada no local da lesão.

O conceito de inespecificidade da resposta imune inata foi recentemente contestado após a descoberta de uma classe de receptores, os receptores do tipo Toll (TLRs), que reconhecem estruturas moleculares conservadas (PAMPs) presentes tanto na superfície quanto nas estruturas que compõem os patógenos. Estes receptores foram inicialmente descritos em drosófilas como um receptor transmembrana do tipo I, com papel importante no desenvolvimento dorso-ventral do embrião da drosófila (Underhill, 2002; Medzhitov, 2001). Adicionalmente, a ausência deste receptor resultou em diminuição de resposta contra bactérias gram-positivas e fungos (*A. fumigatus* e *C. albicans*). Estes dados iniciais sugeriram que os receptores do tipo Toll são componentes importantes da defesa das drosófilas, porque induziam a expressão de drosomicina, uma defensina antifúngica (Lamaitre, 1997). Em mamíferos, foram identificados 11 diferentes receptores envolvidos no reconhecimento de microrganismos e na ativação da resposta imune inata (Underhill, 2002).

Neste contexto, a descoberta dos receptores do tipo Toll (TLRs) revolucionou os mecanismos envolvidos no reconhecimento do sistema imune inato. Os TLRs são moléculas transmembranas que contêm um domínio externo à membrana com seqüências ricas em leucina (LRR), e uma cauda intracelular que mostra grande homologia com o domínio intracelular do receptor para a IL-1 (IL-1R), chamada domínio Toll/IL-1R (TIR) (Takeda, 2004). A ativação do TLR por seus ligantes induz o recrutamento de proteínas adaptadoras específicas. Até o momento, quatro proteínas adaptadoras foram descritas: fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), proteína associada ao TIR (MAL/TIRAP), Toll/IL-1R domain containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) e molécula adaptadora relacionada ao TRIF (TRAM) (Takeda, 2004).

Essas proteínas adaptadoras transduzem o sinal do TIR, ativando quinases e fatores de transcrição como o NF- κ B e STAT-1 (Takeda 2004). Dá-se, dessa maneira, a produção de diferentes moléculas efetoras, citocinas pró-inflamatórias, entre outros mediadores, responsáveis pelas diferentes respostas geradas a partir do reconhecimento de estruturas padrões dos patógenos.

Estudos recentes mostraram a importância dos receptores do tipo Toll (TLRs) na fase inicial de reconhecimento de diferentes patógenos. A família dos receptores do tipo Toll compreende, até o momento, onze proteínas identificadas em mamíferos (11 receptores identificados em camundongos e 10 receptores em humanos) (Sabroe, *et al.* 2002). TLR -1, -2, -4, -5, e -6 são expressos na superfície celular e possuem a função de reconhecer especificamente produtos bacterianos, incluindo as lipoproteínas bacterianas (TLR2 como um heterodímero com TLR1 ou TLR6), LPS (TLR4), ou flagelina (TLR5) (Takeda, 2004). TLR -3, -7, -8, e -9 são localizados nos compartimentos intracelulares (Ahmad-Nejad *et al.*, 2002; Heil *et al.*, 2003; Matsumoto *et al.*, 2003) e especializam-se na detecção de DNA dupla fita (TLR3), o RNA viral (TLR7), ou as seqüências CpG das bactérias e dos vírus (TLR9) (Takeda, 2004). Os neutrófilos humanos expressam o mRNA para todos os TLRs, exceto TLR3 (Neufert *et al.*, 2001) e sua ligação com os respectivos ligantes levam à secreção de citocinas inflamatórias (AAP, 1996; AAP, 1999, ADA, 1996; Terpening *et al.* 2001; Shimazaki *et al.* 2001; Huyoel *et al.*, 2000; Soikknen *et al.* 2000; Li *et al.*, 2000, Fowler 2001, Beck 1999, Meyer *et al.*, 1998, Dongari *et al.*, 1996) com exceção da seqüência CpG, que requer o pré-tratamento dos neutrófilos com GM-CSF (Neufert *et al.*, 2001). Adicionalmente, o DNA bacteriano pode ativar os neutrófilos via TLR9 de uma maneira CpG independente, mecanismo este que ainda precisa ser identificado (Trevani *et al.*, 2003). TLR4 é capaz de mediar a indução de citocinas pró-inflamatórias após estimulação com fungos e bactérias,

enquanto o reconhecimento desse microrganismo por TLR2 conduz, principalmente, à liberação de citocinas antiinflamatórias. Assim, é provável que as diferenças nos componentes de superfície celular dos microrganismos, sejam responsáveis pela ligação a diferentes TLRs e induzam a produção de diferentes padrões de citocinas após o contato entre bactéria e célula hospedeira. A produção de citocinas como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 é observada em estudos *in vitro*, após estímulo de macrófagos e monócitos com diferentes microrganismos (Xiong *et al*, 2000; Veschiarellia *et al*, 1999; Parise-Fortes, 2000), demonstrando que essas células podem ser fontes importantes de citocinas.

O possível envolvimento de TLR4 e TLR2 na doença periodontal humana foi evidenciado, recentemente, devido à detecção de um aumento na expressão dessas moléculas em biópsias de tecido gengival de pacientes com periodontite crônica (Ren, 2006). Porém, o exato papel dos TLRs no desenvolvimento da doença periodontal ainda não foi estabelecido. Poucos são os relatos sobre a interação de *A. actinomycetemcomitans* com TLR2 e/ou TLR4 (Tietze, 2006). Desta forma, o papel dos TLRs na atividade fagocítica e microbicida de neutrófilos e macrófagos contra a infecção por *A. actinomycetemcomitans* e outros periodontopatógenos ainda precisam ser esclarecidos.

A. actinomycetemcomitans é considerado um dos principais periodontopatógenos, sendo relacionado como fator etiológico de determinados casos de periodontite agressiva, e presente em grande número dos casos de periodontite crônica. Essa bactéria foi isolada de lesões actinomicóticas de humanos em 1912 por Klinger e receberam o nome de *Bacterium actinomycetem comitans*, sendo reclassificada, posteriormente, como *Actinobacillus actinomycetencomitans* por Topley e Wilson em 1929 e, como *Haemophilus actinomycetemcomitans*, por Potts e

colaboradores em 1929. As cepas eram classificadas conforme sua dependência do fator X (hemina) para o crescimento. Entretanto, em 2006, Lauritsen e Kilian estabeleceram uma nova classificação filogenética para esta bactéria, baseada agora em dados genotípicos e de dependência do fator V (dinucleotídio adenina nicotinamina) e estas bactérias passaram a ser denominadas como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Lauritsen, 2006).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans pertencente à família *Pasteurellaceae*, é uma bactéria sem motilidade, cocobacilo anaeróbio, gram-negativa, não formadora de esporos, capnofílica (Scannapieco, 1987), catalase positivas e fermentadoras de glucose, frutose, maltose e manose (Lauritsen, 2006). Quando isolados clínicos são semeados para crescer em meio de cultura observa-se o desenvolvimento de colônias circulares, convexas, de textura rugosa com uma estrela ou cruz no centro (Scannapieco, 1987). Após repetidas subculturas, a forma de estrela desaparece, as colônias se tornam esfumaçadas e opacas e não causam cavitação no meio (Henderson, 2003; Lauritsen, 2006). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* é descrita na literatura por possuir cinco sorotipos que são: a, b, c, d, e (Saarela *et al.*, 1992) mas, recentemente, um possível novo sorotipo (f) foi descrito por Kaplan e colaboradores (2001). Os antígenos determinantes do sorotipo são polissacarídeos de superfície termoestáveis que aparentam ser exclusivos da espécie. O sorotipo b parece ser o mais virulento (Slots, 1997).

O mecanismo de patogenicidade de *A. actinomycetemcomitans* não está totalmente compreendido, entretanto, esse microrganismo apresenta vários fatores de virulência determinados pela aderência e invasão tecidual, produção de fatores citotóxicos e imunossupressores (leucotoxina), lipopolissacarídeo (LPS), bacteriocina, proteínas ligantes à porção FC do anticorpo, collagenase e fatores de resistência

antimicrobiana (Page, 1976). A atividade leucotóxica das cepas de *A. actinomycetemcomitans* foi descrita pela primeira vez por Baehni e colaboradores (AAP, 1999), em cepas isoladas de lesão periodontal de pacientes com PAL, determinando-se a capacidade de produtos bacterianos de destruir células fagocitárias humanas. A leucotoxina produzida por esse microrganismo é considerada o fator chave da sua virulência, pela capacidade de destruir as células de defesa do hospedeiro. Essa proteína de 116 KDa, pertencente à família RTX de toxinas (aminoácidos que se repetem na toxina) caracteriza-se por apresentar especificidade celular, lisando leucócitos polimorfonucleares, monócitos, células leucêmicas, células linfóides e macrófagos de primatas humanos e não humanos, mas não destrói fibroblastos, eritrócitos e células endoteliais (AAP, 1996). A leucotoxina é expressa por um *operon* cromossômico constituído de quatro genes: *ltxC*, *ltxA*, *ltxB* e *ltxD*. Também se sabe que a presença do gene *ltxA* é essencial para a atividade citolítica dessa toxina e que a expressão da toxina varia entre cepas de *A. actinomycetemcomitans*, observando-se, assim, cepas altamente leucotóxicas, produzindo de 10 a 20 vezes mais leucotoxina que as cepas consideradas minimamente leucotóxicas (ADA, 1996). O gene *ltxC* codifica uma proteína capaz de ativar a leucotoxina produzida pelo gene *ltxA*, enquanto os genes *ltxB* e *ltxC* codificam peptídeos que estão envolvidos no transporte dessa toxina para a superfície celular bacteriana (ADA, 1996). Cepas de *A. actinomycetemcomitans* altamente leucotóxicas apresentam uma deleção de 530 bp no promotor *ltx*, e as minimamente leucotóxicas não mostram esta deleção (Terpenning, 2001). Iwase e colaboradores observaram que a leucotoxina produzia poros de 96 nm de diâmetro nas membranas de células HL-60. Confirmando esses estudos, Taichman e colaboradores ressaltaram que a formação dos poros também alterava a permeabilidade celular, facilitando o influxo de cálcio e provocando a lise celular (Taichman, 2001).

A adesão de *A. actinomycetemcomitans* às superfícies de células epiteliais, aos dentes e/ou a outras bactérias bucais, assim como a invasão da gengiva, constituem passos iniciais e essenciais na patogênese dos processos periodontais. Estudos mostram que a capacidade de aderência deste microrganismo às células epiteliais bucais ou à hidroxiapatita estaria associada às fímbrias, vesículas extracelulares e/ou material amorfo extracelular (Fine *et al.*, 2006). Proteínas de membrana externa (Omps) encontradas em *A. actinomycetemcomitans* como, por exemplo, Omp 100, Omp 64, Omp 39, Omp 29, Omp 18 e Omp 16 também têm importante papel no estabelecimento da infecção. Destas, a Omp 100 apresenta homologia com YadA da *Yersinia enterocolitica*, UspA da *Moraxella multicauda*, DsrA da *Salmonella typhimurium* e EibA-C da *Escherichia coli* e tem a função de adesão, facilitando a invasão no tecido do hospedeiro (Asakawa, 2003; Fine, 2006).

A cepa JP2 possui um operon (*cdtABC*) que codifica outra toxina comum deste microrganismo, a toxina de distensão do citoesqueleto (CDT). A CDT causa a parada do ciclo celular em G2 (Purdy *et al.*, 2000). Essa toxina inibe o crescimento de fibroblastos, queratinócitos humanos e murinos, e tem atividade imunossupressora sobre células T e B do sistema imune adaptativo humano (Shenker, 1990).

A virulência de tal microrganismo é relacionada à sua marcante capacidade de invasão tecidual, produção de diversas proteases e da leucotoxina, especialmente por determinados clones extremamente virulentos, como o JP2 (Spitznagel *et al.*, 1991, Haubek *et al.*, 2004). Acredita-se que tais fatores de virulência interfiram na resposta imune do hospedeiro, resultando em maior dificuldade na obtenção de sucesso no tratamento de pacientes infectados com *A. actinomycetemcomitans*, assim como provavelmente potencializem os efeitos sistêmicos da infecção periodontal (Saito *et al.*, 1993, Wilson & Henderson 1995, Fives-Taylor *et al.*, 1995, Fives-Taylor *et al.*, 1999).

Entretanto, o papel individual de periodontopatógenos como *A. actinomycetemcomitans* nos efeitos locais e sistêmicos durante o curso da DP não são conhecidos, assim como pouco se sabe a respeito dos mecanismos imunes inatos envolvidos no reconhecimento e controle inicial da infecção periodontal.

Considerando a importância dos neutrófilos como primeira linha de defesa celular contra patógenos e a importância dos receptores do tipo TLR2 no reconhecimento de agentes invasores, avaliamos o papel de TLR2 durante o curso da infecção peritoneal e oral com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Proposição

O presente trabalho tem como objetivo principal a caracterização do papel dos receptores do tipo Toll após a infecção com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Especificamente nossos objetivos foram:

1. Avaliar a atividade fagocítica de neutrófilos no curso da infecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa);
2. Analisar a produção de óxido nítrico, e atividade de mieloperoxidase em culturas de neutrófilos provenientes de animais deficientes de TLR2 após a estimulação com Aa;
3. Avaliar a participação de neutrófilos no curso da infecção por Aa;
4. Analisar a perda óssea e a disseminação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* após a infecção oral em animais deficientes de TLR2.

Material e Métodos

1. Cultura de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa).

Amostras de Aa foram obtidas junto ao Instituto de Ciências Biomédicas da USP - São Paulo e cultivadas no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB em meio TSA (Tryptic Soy Agar D, DIFCO™, BD) acrescido de 0,6% de extrato de levedura (DIFCO™, BD). As placas foram mantidas em jarra de microaerofilia com aproximadamente 5 - 10% de CO₂ em estufa a 37°C por 5 dias. A morfologia das bactérias foi confirmada por Método de Gram e por visualização em estereoscópio (Wild Heerbrugg, Switzerland, MS 23358). A pureza das colônias foi confirmada por teste bioquímico de catalase e por reação de cadeia da polimerase (PCR). A concentração de bactérias utilizada nos experimentos foi determinada com o auxílio da escala de Mac Farland. As bactérias em suspensão foram diluídas de modo a atingir a concentração de 2×10^9 UFC em 50µl de PBS

2. Marcação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* com FITC.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans foi marcado com FITC como descrito previamente (Permpnich *et al*, 2006). Brevemente, 5mL da suspensão de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (2×10^9 bactérias/mL) foram incubadas com 0.1 mg/mL FITC diluído em PBS (Sigma-Aldrich) por 5 horas a 37°C. Em seguida, a suspensão foi lavada três vezes por 10 minutos a 1.300 g. O precipitado obtido foi ressuspenso em 1 mL de meio e pequenas alíquotas foram analisadas em microscopia de fluorescência para a confirmação da marcação das bactérias com FITC. As bactérias foram marcadas e este processo não afetou a viabilidade do microrganismo.

3. Animais de experimentação.

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6, ou geneticamente deficientes do receptor do tipo Toll2 (TLR2^{-/-}), com idade aproximada de seis semanas. Esses animais foram criados no biotério de Animais Isogênicos da Área de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. No decorrer do protocolo experimental, os animais foram mantidos no biotério de Animais Isogênicos da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, em caixas de polipropileno (animais selvagens - WT) ou em microisoladores (animais geneticamente deficientes), com a temperatura e a luz controladas. A água, ração e maravalha foram autoclavadas e disponibilizadas *ad libitum*, exceto no dia da infecção oral onde água e ração foram limitadas até 30 minutos após a inoculação para garantir a adesão bacteriana à superfície dentária. Os grupos experimentais eram compostos por 20 camundongos, que foram monitorados durante o experimento diariamente com relação a possível mortalidade, e tiveram seu peso aferido durante o curso da infecção. A pesquisa foi autorizada pelo Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru (CEEPA-Proc. nº 23/2006).

4. Infecção intraperitoneal dos animais.

Camundongos (C57BL/6 e TLR2^{-/-}) foram inoculados por via intraperitoneal com 2×10^9 bacilos viáveis de *A. actinomycetemcomitans*, diluídos em PBS estéril. Cinco animais de cada grupo foram sacrificados 24 horas após a infecção. A sobrevivência dos animais foi avaliada por um período de 60 dias

5. Avaliação do recrutamento de neutrófilos.

Animais foram sacrificados após 24h e as células do exsudato foram obtidas após lavagem peritoneal com 5mL de RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino. As células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e ressuspensas em 1mL de RPMI completo. O exsudato inflamatório foi analisado através da evidência com solução de Turk e contado em câmara de Neubauer, observando a presença de neutrófilos e macrófagos.

6. Cultivo de células.

Células totais do exsudato peritoneal provenientes de animais normais ou infectados com Aa foram cultivadas em placas de 24 poços (Corning, Corning, NY EUA) (3×10^6 células/poço) em meio RPMI 5% SFB, na ausência ou presença de antígenos de Aa. Após o cultivo os sobrenadantes foram colhidos, centrifugados (250 g por 10 minutos), filtrados em membrana de poro 0,22 mm e estocados a -20°C até o uso (para dosagem de NO).

7. Ensaio de fagocitose.

Animais infectados com Aa por via intraperitoneal foram sacrificados 24 horas após o inóculo. As células do exsudato peritoneal de cada camundongo foram obtidas através da lavagem intraperitoneal com 5 mL de RPMI 5% SFB. O material coletado foi centrifugado a 4 °C e o precipitado ressuspendido em 1 mL de RPMI 5% SFB. Uma amostra de cada lavado foi colocado sobre lâmina (10µL) e corado com May-Grunwald/Giemsa para análise da fagocitose. Foram contados 10 campos aleatórios por lâmina e consideradas células fagocitando aquelas que apresentavam um ou mais grupos

de bactérias em seu citoplasma. Para a análise da fagocitose *in vitro*, as células (1×10^4) foram cultivadas com amostras de *A. actinomycetemcomitans*, previamente marcadas com FITC na proporção de 1:1 (bactérias/células) em lamínulas de 20x20 mm dentro de placas de cultura de células de seis poços. Após 30 minutos, as lamínulas foram lavadas levemente com RPMI e montadas em lâminas e analisadas em microscópio confocal de varredura a laser (Leica TCS-SPE, Mannheim, Alemanha).

8. Atividade de mieloperoxidase.

Células obtidas do exsudato peritoneal dos animais WT e TLR2^{-/-} após infecção com bacilos viáveis de Aa ou inoculados com PBS, foram lavadas e congeladas a -20°C em PBS estéril. Depois, o material foi descongelado, centrifugado e obteve-se o sobrenadante. A atividade da mieloperoxidase foi determinada após incubação desses sobrenadantes com H₂O₂ 0,5mM e tetramethylbenzidina (1,6 mM). A atividade de MPO foi mensurada em leitor de Elisa com uma absorbância de 450 nm.

9. Avaliação da produção de NO.

A produção de NO foi avaliada das culturas de células *in vitro*. Para tal, o sobrenadante foi descongelado e posteriormente, foi mensurada a produção de NO⁻² (nitrito) nos sobrenadantes das culturas, pela reação colorimétrica de Griess (Elahi, 2001). Resumidamente, 100 µL dos sobrenadantes das culturas obtidos e processados como descrito acima, foram adicionados a 100 µL de reagente de Griess e incubados por 10 minutos a 26°C. Em seguida, determinou-se a absorbância (filtro de 540 nm) em leitor de Elisa. Os resultados expressos em µmoles foram determinados pela

comparação com a curva padrão (realizada com nitrito de sódio nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 e 1.5 μ M).

10. Disseminação de *A. actinomycetemcomitans* após infecção peritoneal.

Animais infectados via intraperitoneal com 2×10^9 UFC de *A. actinomycetemcomitans* foram sacrificados após 24 horas e tiveram o baço, o linfonodo inguinal e células do exsudato coletados e avaliados quanto à presença da bactéria. Baço e linfonodo foram retirados, e transferidos para criotubo contendo 1 mL de PBS estéril pesado. Os órgãos foram macerados, pesados e semeados como descrito. Posteriormente, 100 μ L do macerado dos tecidos ou do lavado foram semeados em placas de Petri (100 mm) contendo TSA + 0.6% de extrato de levedura por 15 dias para a determinação das unidades formadoras de colônia (UFC). As UFCs foram dadas como UFC/grama de órgão.

11. Doença periodontal experimental induzida (DPEI).

O modelo de DPEI foi baseado no protocolo usado por Baker, Evans & Roopenian (1994) com algumas modificações. O protocolo de indução de doença periodontal consistiu da inoculação oral de 2×10^9 UFC de *A. actinomycetemcomitans* em 50 μ L de PBS, acrescida de 2% de carboximetilcelulose, sendo esta suspensão aplicada diretamente na cavidade oral dos animais com o auxílio de um micropipetador automático. Após 48 horas e 96 horas, o procedimento de inoculação oral foi repetido. A adição de carboximetilcelulose à suspensão de bactérias possibilita a retenção temporária dos microrganismos e a colonização da cavidade oral por *A. actinomycetemcomitans*; eliminando a necessidade da injeção direta das bactérias dentro

do tecido periodontal ou uso de ligaduras, que podem resultar em trauma mecânico ao tecido. Para a contagem de tempo de infecção, a primeira administração dos microrganismos foi considerada como tempo 0 h. Grupos de camundongos C57BL/6 (WT) e TLR2^{-/-} receberam a inoculação de *A. actinomycetemcomitans* simultaneamente, sendo denominados de “infectados”. Grupos controle consistiam de animais “sham-não infectados” (os quais recebiam a administração oral de 50µl de uma solução 2% de carboximetilcelulose em PBS, com metodologia semelhante à descrita para o grupo anterior).

12. Coleta das amostras.

Diferentes amostras foram coletadas para distintos métodos de investigação. Para a análise de perda óssea e histológica foram coletados tecido gengival palatino, molares superiores e tecido periodontal subjacente (ligamento e tecido ósseo alveolar e palatino). Para sua remoção, eram realizadas duas incisões na região palatina, uma mesial e outra distal aos molares, ambas perpendiculares à linha média, sendo em seguida seccionado o arco zigomático, assim como as bases dos processos alveolares direito e esquerdo. As amostras eram então fragmentadas com auxílio de um cinzel, transferidas para um microtubo contendo Trizol (Invitrogen Life Technologies, EUA), e armazenadas a -70°C (para análise da presença de Aa nos tecidos através da reação de cadeia da polimerase - PCR). As amostras coletadas para a análise histopatológica eram compostas de tecido gengival palatino e vestibular, molares superiores e tecido periodontal subjacente (ligamento e tecido ósseo alveolar), embebidas em solução de formol a 10% e armazenadas a temperatura ambiente. Os molares e o tecido ósseo foram armazenados em peróxido de hidrogênio (3%) para análise do padrão de perda óssea.

Além da coleta de amostras de tecido periodontal, fragmentos de coração, pulmão, fígado, linfonodo cervical superficial, rim e baço foram coletados para análise histológica (armazenados em formol, como previamente descrito) e quantificação da carga bacteriana através da contagem da unidade formadora de colônia (UFC) (armazenados em PBS estéril e semeados em placas com Tryptic Soy Agar). Determinados com base em estudos anteriores, o sacrifício dos animais e coleta de amostras foram realizadas nos tempos de 0h, 3, 7, 9, 30 e 60 dias após a inoculação inicial de *A. actinomycetemcomitans*.

13. Isolamento de *A. actinomycetemcomitans*.

Após o sacrifício dos animais, foi coletada uma amostra de biofilme dental e saliva da região dos dentes posteriores da maxila com auxílio de um *swab*, e transferida para tubos estéreis contendo 10 mL de BHI (Brain Heart infusion, DIFCO™, BD). Os tubos foram colocados em microaerofilia ou estufa por 7 dias na tentativa de proporcionar o crescimento de *Aa* e outros patógenos. As culturas foram utilizadas para identificar a microbiota oral dos animais por meio seletivo. Para identificação da microbiota por meio seletivo, 10 µL do caldo BHI foram plaqueados em ágar Tryptic Soy + 0,6% de extrato de levedura (TSA) para crescimento de *Aa*, ágar Mitis salivaris (MS) para crescimento de *Streptococcus* spp, Staphylococcus manitol salt (MAS) para crescimento de *Staphylococcus* e Ágar Sabouraud Dextrose (Sb) para crescimento de fungos.. Após sete dias, foram registradas as unidades formadoras de colônia (UFCs) e a morfologia bacteriana foi analisada por coloração de Gram. A presença de bactérias nos tecidos obtidos de animais infectados também foi avaliada. Para tal as amostras de tecidos foram pesadas e maceradas em PBS estéril. Em seguida, 10 µL dessas soluções

foram cultivados por 7 dias em meio TSA + extrato de levedura e as unidades formadoras de colônia (UFCs) de *Aa* determinada por miligrama de órgão.

14. Extração de DNA bacteriano.

Para a detecção da presença de *A. actinomycetemcomitans* nos diferentes tecidos (fígado, rins, coração, pulmão, linfonodo e baço) foram utilizadas reações de PCR. A extração de DNA bacteriano foi realizada conforme método previamente descrito (ÁVILA-CAMPOS *et al.* 2002, Garlet, 2006), com pequenas modificações. Para tanto, após a coleta dos órgãos e armazenamento em trizol, como previamente descrito, os mesmos foram homogeneizados através da utilização de um triturador de tecidos (UltraTurrax 8.0; IKA, Staufen, Alemanha). As amostras foram então centrifugadas a 13000 *g* por 10 minutos, sendo o sedimento ressuspensionado em 500 µl de trizol e clorofórmio, e novamente centrifugadas, tratadas com citrato de sódio 0,1M em etanol 10%, com etanol 75% e ressuspensionadas em 100 µl de água DNase/ RNase free e 100 µl de Instagene. As amostras foram termocicladas por trinta minutos a 56 °C, então fervidas por 10 minutos, e novamente centrifugadas. Para a detecção do DNA de *A. actinomycetemcomitans*, 10µl da amostra foram utilizados para a realização de reações de cadeia da polimerase (PCRs) utilizando a enzima Taq polimerase (Gibco – Life Technologies) no termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, EUA). As condições básicas da reação de PCR para detecção de *A. actinomycetemcomitans* foram: 30 ciclos de 1 minuto a 94°C para desnaturação, 1 minuto a 54°C para anelamento dos primers e 2 minutos 72°C de extensão, acrescidos de um passo de extensão final de 7 minutos a 72°C, com o primer específico (5'- AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC 3') (5'-ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT-3'). Como controle positivo da reação de amplificação, foi utilizada uma amostra de DNA proveniente de cultura de

Aa. Uma amostra negativa (água) foi submetida a reação com a sequência do primer utilizado. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio. Os géis foram fotografados (UVP Life-Science Software Image acquisition). Todas as reações de PCR foram realizadas na disciplina de Fisiologia e Farmacologia FOB-USP, com o auxílio do Professor Dr. Carlos Ferreira dos Santos.

15. Avaliação da reabsorção óssea alveolar.

O modelo utilizado para análise de perda óssea foi baseado no protocolo usado por Garlet *et al* (2006). Resumidamente, após a DPEI, a maxila dos camundongos foi removida, separada em hemi-arcos e o tecido duro foi mantido em peróxido de hidrogênio 3 % m/v (10 volumes, LBS, Laborasa, Ind. Farmacêutica LTDA, SP) por 3 dias para a remoção do restante do tecido mole. Decorrido este período, as peças contendo apenas tecido ósseo e dentes foram delicadamente lavadas em soro fisiológico e colocadas para secar em temperatura ambiente, sobre uma placa de vidro. Quando secas, as peças foram imersas em uma solução de azul de metileno e água (2:1) para evidenciar a junção amelo-cementária. Cada hemi-maxila foi posicionada sobre um papel milimetrado e com uma câmera fotográfica acoplada a um estereoscópio foram feitas imagens da face palatina (2,5 de aumento). Com o auxílio do Programa Image J 1.36b (Wayne.Rasband, National Institutes of Health, USA) as imagens foram submetidas a um cálculo de área (mm²), entre a junção amelo-cementária (JAC) e a crista óssea alveolar (COA) (**Figura I e II**).

16. Análise histopatológica.

A peça contendo tecido peridontal, ósseo e os molares superiores foram coletadas como descrito anteriormente e fixada em solução de paraformaldeído 4%, pH 7.4, em temperatura ambiente, pelo tempo mínimo de 48 h. Após a fixação, as peças foram descalcificadas em solução a 10% de ácido tricloroacético, em temperatura ambiente, pelo tempo de 4 semanas. Em seguida, as peças foram colocadas em solução de sulfato de sódio a 5%, para neutralização da reação. O passo seguinte foi a desidratação gradativa em álcool, seguida de xilol e processamento em parafina. Cortes seriados com espessura de 3 µm foram obtidos através de um micrótomo, montados em lâminas e corados com coloração em hematoxilina e eosina. A análise histopatológica foi realizada através da análise de cortes seriados em microscopia ótica, visando basicamente a análise da presença e da localização de células inflamatórias nos tecidos periodontais, assim como as características histológicas do epitélio juncional. Baço, fígado, rim, linfonodo cervical superficial, coração e pulmão também foram processados como descrito acima, exceto pela utilização de EDTA.

17. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão médio (SEM) dos resultados obtidos para cada grupo. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa PRISMA 4 (PRISMA software, GraphPad, San Diego, CA). Valores de $p < 0.05$ foram considerados com indicativo de significância.

Figura I. Análise da perda óssea. Camundongos submetidos ao protocolo de DPEI foram sacrificados, as maxilas removidas e preparadas para fotografia em estereoscópio. As imagens foram submetidas a cálculo de área entre JAC e COA com o auxílio do programa Image J, em mm². A linha tracejada indica a marcação do papel milimetrado utilizada para calibrar o programa. COA: crista óssea alveolar, JCE: junção cimento-esmalte.

FIGURA II. Ilustração da perda óssea dos animais selvagens e deficientes de TLR2. Imagens obtidas com Lupa estereoscópica e 2,5X. As ilustrações A, C, E, G, foram obtidas de maxilas de animais selvagens nos tempos de 0, 3, 7, 9 dias de infecção. Ilustrações B, D, F, H representam animais TLR2^{-/-} nos períodos de 0, 3, 7, 9 dias de infecção. Ilustração K e L mostram a perda óssea no período de 30 dias, para animais selvagens e TLR2^{-/-} respectivamente.

RESULTADOS

1. A ausência de TLR2 não interfere com a sobrevivência de camundongos C57BL/6 após a infecção peritoneal com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Com o intuito de determinar a influência do receptor TLR2^{-/-} durante a infecção peritoneal por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), camundongos selvagens (WT_{TLR2}) e geneticamente deficientes de TLR2 foram infectados com 2 x 10⁹ bacilos viáveis de Aa por via intraperitoneal. A sobrevivência dos animais foi observada durante 60 dias após a infecção.

Os resultados mostraram que 100% dos animais TLR2^{-/-} e WT sobreviveram à infecção (Figura 1). Adicionalmente, durante o período de observação, não foram detectados nenhuma alteração de comportamento ou comprometimento fisiológico dos animais. Esses resultados demonstraram que a ausência de receptor TLR2 não influenciou a sobrevivência dos animais após a infecção intraperitoneal com *A. actinomycetemcomitans*.

2. A ausência de TLR2 leva a um menor recrutamento de leucócitos após a infecção peritoneal com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Para avaliar a influência de TLR2 na migração de células para o sítio de infecção, animais TLR2^{-/-} e WT_{TLR2}, foram inoculados por via intraperitoneal com 2 x 10⁹ bacilos viáveis de Aa. Após 24 horas, o peritônio foi lavado e as células inflamatórias coletadas e contadas em câmara de Neubauer.

Os resultados demonstraram que a ausência de TLR2 diminuiu o número de células recrutadas para o foco da infecção, quando comparados aos animais selvagens (WT_{TLR2}) (Figura 2A). No peritônio de animais controle, inoculados apenas com PBS, observou-se um baixo recrutamento de leucócitos para o local do inóculo (Figura 2A). A contagem diferencial do infiltrado inflamatório revelou um predomínio de

FIGURA 1. Análise da sobrevivência de camundongos TLR2^{-/-} e seu grupo selvagem (WT_{TLR2}^{-/-}) após infecção intraperitoneal com *A. actinomycetemcomitans*. O gráfico representa a sobrevivência de camundongos TLR2^{-/-} e selvagem (WT_{TLR2}^{-/-}) infectados por via intraperitoneal com 2×10^9 bacilos viáveis de Aa e observados por um período de 60 dias. Os resultados mostraram que tanto os animais selvagens (quadrado aberto), quanto os animais deficientes de TLR2 (círculo fechado) sobreviveram durante o período de infecção. Esses resultados são representativos de três experimentos independentes, com um total de 3 animais por grupo.

macrófagos recuperados da cavidade peritoneal de animais selvagens e deficientes de TLR2 após a infecção por Aa (Figura 2B). Em relação ao número de neutrófilos, isolou-se do peritônio de animais WT_{TLR2} e TLR2^{-/-} uma baixa percentagem destas células quando comparado ao número de macrófagos. Observando-se um leve aumento na percentagem de neutrófilos recuperados de animais TLR2^{-/-}, quando comparado aos animais WT. Os resultados apresentados indicam o envolvimento de TLR no reconhecimento e ativação de leucócitos após o desafio com *A. actinomycetemcomitans*.

3. Células inflamatórias de animais deficientes de TLR2 apresentaram menor atividade fagocítica após estímulo com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Para a avaliação da atividade fagocítica, as células recém isoladas da cavidade peritoneal de animais TLR2^{-/-} e selvagens infectados com Aa foram coradas por May-Gruwald/Giemsa a percentagem de fagocitose determinada (GASPAROTO *et al*, 2004).

Na análise dos dados, observou-se que os macrófagos de animais TLR2^{-/-} apresentaram uma diminuição na capacidade fagocítica (Figura 3A), quando comparados às células de animais selvagens (WT_{TLR2}). A análise da proporção de neutrófilos e macrófagos fagocitando revelou que a ausência de TLR2 diminuiu a capacidade fagocítica destas células (Figura 3B).

A análise da atividade fagocítica *in vitro* confirmou os dados obtidos *in vivo*, onde se observou que as células dos animais selvagens C57BL/6 (Figura 3C) apresentaram uma maior atividade fagocítica quando comparada com as células obtidas de animais TLR2^{-/-} após o cultivo com a bactéria (Figura 3D).

FIGURA 2. Caracterização do infiltrado inflamatório isolado de animais selvagens (WT_{TLR2}^{-/-}) e deficientes TLR2 (TLR2^{-/-}) após desafio com *A. actinomycetemcomitans*. Camundongos WT_{TLR2} e TLR2^{-/-} foram inoculados por via intraperitoneal com 2×10^9 bacilos viáveis de Aa. Após 24 horas, a cavidade peritoneal foi lavada com meio RPMI e as células coletadas e contadas em câmara de Neubauer. **(A)** As barras representam o número de células totais viáveis (x10⁶) presente no exsudato peritoneal de animais selvagens (barra aberta) os animais TLR2^{-/-} (barras fechada). **(B)** As barras representam a percentagem de macrófagos e neutrófilos presentes no exsudato peritoneal dos animais WT_{TLR2}^{-/-} e TLR2^{-/-}. Os resultados são a média $\pm$ SEM de três experimentos independentes, com um total de seis animais por grupo.

FIGURA 3. Células de animais deficientes de TLR2 (TLR2^{-/-}) apresentaram atividade fagocítica diminuída. Camundongos selvagens (WT_{TLR2}^{-/-}) e deficientes TLR2 foram inoculados por via intraperitoneal com 2×10^9 bacilos viáveis de Aa. Após 24 horas, a cavidade peritoneal foi lavada e as células do exsudato coletadas. **(A)** As barras representam o total de células fagocitando nos animais WT_{TLR2}^{-/-} (barra aberta) e TLR2^{-/-} (barra fechada). **(B)** As barras representam a percentagem de neutrófilos e macrófagos recém isolados da cavidade peritoneal que fagocitaram pelo menos uma bactéria. Foram contados 10 campos aleatórios em cada lamina sendo representada a média $\pm$ SEM obtida para cada grupo de animais. Os resultados são a média $\pm$ SEM de três experimentos independentes, com um total de seis animais por grupo. **(C e D)** Ensaio de fagocitose *in vitro* com Aa marcado com FITC na proporção de 1:1. **C**, células de animais controle e em **D**, células de animais TLR2^{-/-}.

4. A ausência de TLR2 leva a uma menor atividade de mieloperoxidase após a infecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

A mieloperoxidase é uma enzima que apresenta importante atividade microbicida em infecções bacterianas e fúngicas (Hirchem, 2005) e é considerada como um marcador de neutrófilos ativados (Klebanoff, 2005). Para avaliar a influencia de receptores Toll na ativação de neutrófilos após a infecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, analisou-se a atividade de mieloperoxidase em células recém isoladas da cavidade peritoneal de animais TLR2^{-/-} e WT_{TLR2^{-/-}}. Os resultados revelaram que uma menor atividade da enzima foi detectada no exsudato de animais TLR2^{-/-} quando comparado às células de animais selvagens (WT). Em adição, na ausência de estímulo (infecção apenas com PBS) a atividade da enzima também foi menor em células de animais TLR2^{-/-}, quando comparada com os animais selvagens (WT). Os resultados mostraram a consequente diminuição da atividade enzimática por células de animais deficientes de TLR2 (Figura 4).

5. Células de camundongos deficientes de TLR2 apresentam menor produção de óxido nítrico após estimulação com antígenos de *A. actinomycetemcomitans*.

Estudos demonstram que a produção de óxido nítrico (NO) mediada pela enzima iNOS pode matar certos periodontopatógenos, estando este mediador potencialmente envolvido no controle da infecção periodontal. Desta forma, é possível que antígenos das bactérias entrem em contato com as células do hospedeiro, primeiramente com os neutrófilos e macrófagos, os quais podem desencadear uma resposta inflamatória. Nesse sentido, foi analisada a capacidade de antígenos de Aa (lisado de *A. actinomycetemcomitans*, AgAa) de estimular macrófagos e neutrófilos de camundongos WT_{TLR2} e TLR2^{-/-} a produzirem óxido nítrico. Para tal, células recém isoladas foram

FIGURA 4. Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). As células obtidas da cavidade peritoneal de camundongos WT_{TLR2}^{-/-} e TLR2^{-/-} foram coletadas 24 horas após a infecção com *A. actinomycetemcomitans*. A atividade da enzima MPO foi determinada por método colorimétrico. As barras representam à média $\pm$ SEM da atividade de MPO das células inflamatórias recém isoladas, para cada grupo de animais analisados.

* $p < 0,05$, quando comparado com o grupo controle.

cultivadas na presença ou ausência de AgAa. Após 48 horas, os níveis de óxido nítrico foram avaliados pelo método de Griess.

Como pode ser observado na Figura 5, o cultivo com o antígeno de Aa não induziu um aumento na produção de óxido nítrico por células de animais selvagens. De forma relevante, a estimulação com AgAa diminuiu a produção de óxido nítrico por células de animais deficientes de TLR2 (Figura 4).

6. Camundongos deficientes de TLR2 apresentaram uma alta taxa de disseminação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Animais TLR2^{-/-} e WT_{TLR2}^{-/-}, foram desafiados por via intraperitoneal com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e, após 24 horas, sacrificados e os linfonodos regionais e o baço coletados para a análise da disseminação bacteriana.

A contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), após 15 dias em microaerofilia revelou uma maior recuperação de Aa do baço de animais deficientes de TLR2, sendo a diferença não significativa quando comparado com animais selvagens (Figura 6A). Os resultados mostraram que não houve recuperação de bactérias viáveis do exsudato e linfonodos de animais deficientes de TLR2 e WT_{TLR2} (Figura 6B e C). Esses resultados indicam que a disseminação da bactéria para baço é maior no grupo de animais que não possuem o receptor do tipo Toll 2 (TLR2^{-/-}).

7. Análise da sobrevida de animais C57BL/6 e deficientes TLR2^{-/-} após indução da doença periodontal.

Com o intuito de determinar a influência do receptor TLR2^{-/-} durante a infecção oral por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), camundongos selvagens (WT_{TLR2}) e geneticamente deficientes de TLR2 foram infectados com 2 x 10⁹ bacilos

FIGURA 5. Antígeno de *A. actinomycetemcomitans* induz células do peritônio de camundongos deficientes de TLR2 a produzirem baixas concentrações de NO. As células do lavado peritoneal obtidas de camundongos selvagens (barra aberta) e deficientes de TLR2 (barra fechada) foram cultivadas na presença (AgAa) ou ausência de lisado de Aa (Meio). Após 48 horas, o sobrenadante das culturas foi coletado e dosado a concentração de óxido nítrico pela reação de Griess. As barras representam os valores de NO presente na cultura de células do exsudato peritoneal de animais WT_{TLR2}^{-/-} e TLR2^{-/-}. Os resultados são a média $\pm$ SEM de três experimentos independentes, com um total de seis animais por grupo. * $p < 0,05$.

FIGURA 6. Recuperação de Aa do exsudato, baço e linfonodo de animais selvagens (WT_{TLR2}^{-/-}) e deficientes de TLR2 após a infecção peritoneal por *A. actinomycetemcomitans*. Camundongos selvagens (WT_{TLR2}^{-/-}) (barra aberta) e TLR2^{-/-} (barra fechada) foram infectados por via intraperitoneal com 2×10^9 bacilos viáveis de Aa. **(A)** Após 24 horas, os animais foram sacrificados, o baço e o linfonodo retirados, macerados, plaqueados e colocados em microaerofilia por 15 dias para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). **(B)** As barras representam o número de UFC obtidas após semeadura do exsudato peritoneal recém isolado de animais selvagens e nocautes. Os resultados são representativos de três experimentos independentes com um total de sei animais por grupo. ND: não detectado

viáveis de Aa por via oral. A sobrevivência dos animais foi observada durante 60 dias após a infecção.

Os resultados mostraram que 100% dos animais TLR2^{-/-} e WT sobreviveram à infecção (Figura 7). Adicionalmente, durante o período de observação, não foram detectados nenhuma alteração de comportamento ou comprometimento fisiológico dos animais. Esses resultados demonstraram que a ausência de receptor TLR2 não influenciou a sobrevivência dos animais após a infecção oral com *A. actinomycetemcomitans*.

8. Diversidade microbiológica oral dos animais C57BL/6 e TLR2^{-/-} antes e após a indução da doença periodontal.

Um ponto crítico na patogênese das DP, porém raramente investigado em modelos experimentais, diz respeito ao controle da infecção periodontal. Buscando caracterizar a cinética de infecção no curso da DP experimental, camundongos C57BL/6 e TLR2^{-/-} que receberam a inoculação oral de *A. actinomycetemcomitans* tiveram amostras de material aderido à superfície dentária coletadas e semeados em meios de cultivo próprios (Figura 8). A contagem das unidades formadoras de colônia para os diferentes microorganismos analisados revelou que os animais selvagens e deficientes não infectados possuíam a mesma composição de biofilme, entretanto, os valores detectados foram menores no biofilme de animais TLR2^{-/-}. Após a infecção não se observou alterações do biofilme e das UFC para as espécies analisadas. De forma diferente, a infecção com Aa levou a um aumento no número de UFC para *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, fungos e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* no biofilme de animais TLR2^{-/-}.

FIGURA 7. Sobrevivência de camundongos WT e TLR2^{-/-} após modelo de DPEI com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Camundongos selvagens (WT) e TLR2^{-/-} foram infectados oralmente com 2×10^9 bacilos viáveis de Aa, e o tempo de vida foi avaliado por um período de 60 dias. Os resultados são representativos de três experimentos realizados separadamente com 10 animais por grupo.

FIGURA 8. Diversidade microbiológica presente na cavidade oral de camundongos C57BL/6 e TLR2^{-/-} após a infecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Amostras de saliva e de biofilme foram obtidas de camundongos C57BL/6 (A) e TLR2^{-/-} (B) no momento da infecção e em diferentes períodos após a infecção oral com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Após 0, 3, 7, 9 e 30 dias de infecção, os animais foram sacrificados e determinado o número de UFC de *A. actinomycetemcomitans*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* e *Fungus spp.* Os dados são representativos de três experimentos independentes com três animais por período de infecção.

9. Avaliação da perda óssea alveolar.

Nosso próximo passo foi a análise do desenvolvimento da resposta inflamatória em resposta a inoculação oral de *A. actinomycetemcomitans* em camundongos C57BL/6 e TLR2^{-/-}. Para tanto, os animais submetidos à inoculação das bactérias foram analisados inicialmente quanto à perda óssea alveolar, em diferentes tempos pós-infecção (Figura 9).

Os resultados revelaram que camundongos TLR2^{-/-} submetidos ao protocolo de infecção com *A. actinomycetemcomitans* apresentaram significativa reabsorção óssea alveolar, determinada pelo crescente aumento na área compreendida entre a junção amelo-cementária (JAC) e a crista óssea alveolar (COA) nos tempos de 30 (P<0.001) e 60 (P<0.001) dias pós-infecção (Figura 9), quando comparados aos grupos controle. Ao contrário, os animais TLR2^{-/-} não infectados e WT-infectados não apresentaram perda óssea no período estudado (Figura 9).

10. Análise histopatológica de tecido gengival de animais submetidos à DPEI.

A partir das amostras de tecido gengival obtidas de animais WT e TLR2^{-/-} infectados via oral por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foram confeccionados cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina para a análise microscópica.

A análise histológica foi inicialmente realizada em amostras de tecidos periodontais de camundongos C57BL/6 e TLR2^{-/-} não infectados (Figura 10 A e B). Nestas amostras, identificou-se microscopicamente a presença de mucosa gengival revestida por epitélio pavimentoso estratificado, em continuidade com o epitélio sulcular que se continua como epitélio juncional. Subjacente observou-se tecido conjuntivo fibroso, composto por fibras colágenas, pequenos vasos e discreto infiltrado

FIGURA 9. Quantificação da perda óssea alveolar induzida por *A. actinomycetemcomitans* em animais WT e TLR2^{-/-}. Camundongos C57BL/6 (■) e TLR2^{-/-} (▲) submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A. actinomycetemcomitans* e grupos de animais não infectados C57BL/6 (□) e TLR2^{-/-} (Δ) (sham) foram analisados quanto perda óssea alveolar. A figura representa o aumento na distância entre a junção amelo-cementária (JAC) e a crista óssea alveolar (COA) na face palatina dos molares, medida em milímetros com o programa Image J 2.0, em relação aos animais controle. Os resultados apresentados representam os valores da média ± SEM, da área JAC-COA (obtidos de 10 animais) em cada tempo, representativos de três experimentos independentes. *p<0.001

Figura 10. Análise histológica de maxila de camundongos selvagens e deficientes de TLR2 após DPEI. Vista panorâmica de um corte microscópico correspondente ao período 0h de animais $WT_{TLR2^{-/-}}$ (A) e $TLR2^{-/-}$ (C). Após 30 dias, os animais apresentaram destruição dos tecidos periodontais, sendo que nos animais selvagens (C), o comprometimento periodontal foi mais discreto que nos animais deficientes de $TLR2^{-/-}$ (D).

inflamatório composto, principalmente, por polimorfonucleares, muitas vezes no interior dos epitélios juncional e sulcular.

A análise histológica dos tecidos periodontais de camundongos WT infectados demonstrou que três dias após a infecção o tecido ainda apresentava integridade do epitélio juncional, com a presença de pequeno infiltrado inflamatório. No período de sete e nove dias após a infecção a análise do tecido gengival de animais selvagens revelou um pequeno infiltrado inflamatório com baixo comprometimento do tecido. No período de 30 dias, no tecido periodontal de animais WT observou-se um aumento do infiltrado inflamatório em relação ao observado nos períodos anteriores. Observou-se também vascularização aumentada e discreta perda óssea (Figura 10 C). A análise histológica dos tecidos periodontais de camundongos TLR2^{-/-} infectados demonstrou que, três dias após a infecção, o tecido apresentava integridade do epitélio juncional, com a presença de pequeno infiltrado inflamatório (Figura 10 D). Após sete e nove dias de infecção foi possível observar no tecido periodontal de animais deficientes de TLR2 a presença de um intenso infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo próximo ao epitélio do sulco sendo composto, principalmente, por macrófagos. No período de 30 dias, no tecido periodontal de animais TLR2 observou-se um aumento significativo do infiltrado inflamatório, bem como um aumento da vascularização e intensa perda óssea.

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

Estudos recentes têm sugerido que as DPs podem levar a uma resposta inflamatória sistêmica do hospedeiro, interferindo em sua saúde e até mesmo agravando ou predispondo a ocorrência de diversos estados patológicos. Buscando investigar possíveis efeitos sistêmicos da DP experimental, camundongos C57BL/6 e TLR2^{-/-} infectados foram analisados com relação à disseminação da bactéria e desenvolvimento

de resposta inflamatória em outros tecidos. Para tal, amostras de linfonodo cervical superficial, baço, fígado, rim, coração e pulmão obtidas de animais WT e TLR2^{-/-} infectados por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, foram obtidas e confeccionados cortes histológicos destes materiais e corados com hematoxilina e eosina para a análise microscópica

Os cortes histológicos mostraram que baço e linfonodo foram os órgãos com maior infiltrado inflamatório, composto principalmente por macrófagos nos períodos entre 7 e 9 dias, nos animais deficientes de TLR2 (Figura 11 A). O mesmo padrão foi observado no fígado com a presença de macrófagos entre os hepatócitos no período de 3 dias. No coração observou-se a presença de infiltrado inflamatório na túnica adventícia, próxima aos pequenos vasos sanguíneos nos animais deficientes no período de 7-9 dias. Também foram encontradas células inflamatórias entre as células de Purkinje nesses animais. No rim e pulmão não foi observada a presença de células inflamatórias ou comprometimento das estruturas em ambos os grupos de camundongos (dados não apresentados)

12. Disseminação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* após indução da doença periodontal.

Em doenças sistêmicas humanas como meningites, endocardites e osteomielites têm-se detectado a presença de Aa em tecidos diferentes à cavidade oral (Van Winkelhof & Slots, 1999). Dessa forma, após a infecção oral dos animais, foram coletados linfonodo cervical superficial, baço, fígado, rim, coração e pulmão na tentativa de detectar o periodontopatógeno. Os resultados revelaram a presença da bactéria em diferentes tecidos. Os resultados mostraram que foi possível obter DNA positivo para Aa das amostras de fígado, coração e pulmão dos animais (Figura 12)

FIGURA 11. Análise histológica de linfonodo cervical superficial, baço, fígado, rim, coração e pulmão de animais C57BL/6 e TLR2^{-/-}. Após a indução da DPEI, linfonodo, baço, fígado, rim, coração e pulmão foram fixados, processados e corados com hematoxilina e eosina. A análise das laminas demonstrou a presença de infiltrado inflamatório principalmente nos órgãos linfóides superficial cervical, fígado e baço. Macrófagos eram as células predominantes e havia mais áreas com células inflamatórias nos órgãos obtidos de animais deficientes de TLR2. Imagem ilustrativa de baço de animal TLR2^{-/-} com 9 dias de infecção após DPEI, seta laranja demonstra presença de macrófagos e seta azul presença de neutrófilos.

PCR

sendo essa positividade aumentada com o decorrer da infecção. A análise do coração revelou a presença de DNA de Aa aos três dias de infecção e essa detecção foi observada aos 30 dias de infecção em ambos os grupos, no entanto, com maior frequência nos animais selvagens quando comparado aos animais deficientes de TLR2 (Figura 12).

Na análise dos tecidos pulmonares, a detecção de DNA de Aa foi positiva para animais selvagens até 7 dias depois da infecção, todavia nos animais deficientes ela passou a ser detectada com 3 dias da infecção e permaneceu estável até o final do período analisado (30 dias) (Figura 12C).

FIGURA 12. Frequência de positividade para DNA de *A. actinomycetemcomitans*. Camundongos C57BL/6 (■) e TLR2^{-/-} (▲) submetidos ao protocolo de indução de doença periodontal com *A.actinomycetemcomitans* foram analisados quanto a disseminação da bactéria para tecidos periféricos por PCR. Em dias pré-estabelecidos foram colhidas amostras de linfonodo cervical superficial, baço, fígado, rim, coração e pulmão e este foram armazenados em trizol. As amostras foram processadas para obtenção de DNA de Aa conforme as orientações do fabricante. Os gráficos representam a positividade em porcentagem de positividade para a detecção do DNA bacteriano obtida nas amostras de (A) fígado, (B) coração e (C) pulmão. Nos demais órgãos não foi detectada a presença da bactéria. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ SD, da frequência de positividade (obtidos de 10 animais) em cada tempo, representativos de três experimentos independentes

As doenças periodontais (DPs) são alterações crônicas inflamatórias dos tecidos de suporte dos órgãos dentais, cuja etiologia é dependente da presença de bactérias periodontopatogênicas. Apesar da presença de microrganismos ser fundamental para o início do desenvolvimento da maioria das doenças periodontais, a amplificação e progressão desse processo é altamente dependente da resposta imune e inflamatória gerada pelo hospedeiro em resposta a esses patógenos e seus produtos. Acredita-se que a resposta seja responsável pela proteção do hospedeiro contra a infecção bacteriana, contudo, não se conhece qual o nível de tal proteção (AAP 1996; Page 1998; Fowler, Cappelli 2000). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) é uma bactéria gram-negativa comumente associada a doença periodontal agressiva (Ooshima *et al.*, 2003, Tietze *et al.*, 2006, Sakai *et al.*, 2007). Apesar deste microrganismo estar associado com inúmeras doenças sistêmicas esta correlação ainda não está bem estabelecida (Van Winkelhoff, 1999; Lauritsen, 2006).

Com o objetivo de investigar a participação de receptores do tipo Toll (TLR2) na ativação de células da resposta imune inata e no estabelecimento de infecção sistêmica após a infecção experimental por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, inicialmente avaliamos a sobrevivência de camundongos (WT_{TLR2} e TLR2^{-/-}) após o desafio intraperitoneal com a bactéria. A ausência de TLR2 não interferiu na sobrevivência dos animais após a infecção com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Desta forma nossos resultados demonstraram que a ausência deste receptor não leva a um aumento na mortalidade dos camundongos após a infecção intraperitoneal por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Resultados similares foram obtidos em outros estudos que demonstraram que a ausência deste receptor torna os camundongos mais susceptíveis a diferentes infecções bacterianas (*Chlamydia pneumoniae*) (Rodriguez, 2006),

(*Porphyromonas gingivalis*) (Kikkert *et al*, 2007) e fúngicas (*Candida albicans*) (Villamon, 2004).

Para avaliar a influência dos receptores do tipo Toll na migração de células para o sítio de infecção, em seguida, quantificamos e caracterizamos o infiltrado inflamatório presente no peritônio de animais WT_{TLR2} e TLR2^{-/-}. A análise do infiltrado peritoneal desses animais, após 24 horas, demonstrou que a ausência do receptor TLR2 não influenciou de forma significativa a migração de macrófagos e neutrófilos para o sítio da infecção (Figura 2). Esses dados indicam que o receptor TLR2 não é fundamental para a ativação de células residentes e de células da imunidade inata após o desafio intraperitoneal com a bactéria. Provavelmente, macrófagos residentes TLR2^{-/-} conseguiram reconhecer a bactéria via outro receptor do tipo Toll ou outro tipo de receptor para padrões moleculares, como os receptores do tipo “scavengers” envolvidos no reconhecimento tanto de células apoptóticas como de uma variedade de patógenos (Ricote *et al*, 2004). De fato, dados recentes têm demonstrado que macrófagos são capazes de reconhecer e interagir com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* via TLR4 o que leva a uma ativação efetiva dos macrófagos e o desencadeamento de várias funções efectoras (Suzuki *et al*, 2004)).

Após termos estabelecido que a ausência de TLR2 não influenciou significativamente a fase inicial de reconhecimento do patógeno e indução da resposta inflamatória *in vivo*, avaliamos o impacto da ausência deste receptor nos mecanismos de reconhecimento e ativação de neutrófilos e macrófagos *in vitro* e *in vivo* após o desafio com a bactéria. Para tal avaliamos a capacidade de macrófagos e neutrófilos TLR2^{-/-} em fagocitar *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Os resultados revelaram que a ausência de TLR2 levou a uma diminuição no número de neutrófilos e macrófagos

fagocitando a bactéria tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Assim, este importante mecanismo de defesa da imunidade inata se apresenta prejudicado na ausência do receptor TLR2, o que indicaria que TLR2 participa do processo de ingestão de microorganismos por neutrófilos e macrófagos. Uma explicação possível para a diminuição da fagocitose na ausência de TLR2 poderia ser devido ao fato de que a ativação via TLR2 pode causar a expressão de diversos receptores fagocíticos (Blander & Medzhitov, 2006) e, conseqüentemente, aumentar a taxa de fagocitose. Por outro lado, é crescente na literatura o número de informações que demonstram o envolvimento deste receptor na sinalização para a fagocitose de microorganismos. Dados da literatura mostraram que neutrófilos pré-estimulados por agonistas de TLR2 tem um aumento em sua função fagocítica. Adicionalmente, animais MyD88^{-/-} apresentaram taxa de fagocitose prejudicada e menor quantidade de leveduras mortas de *C. albicans* intracelulares (De Luca *et al*, 2007), o que demonstra que a sinalização via MyD88 está envolvida no mecanismo de fagocitose de *Candida albicans*. Portanto, a ausência de TLR2 poderia estar danificando este caminho de ativação e prejudicando a fagocitose de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Os mecanismos de defesa mediados por neutrófilos e macrófagos envolvem tanto a fagocitose quanto a morte dos microorganismos através da geração de mediadores microbicidas, entre eles o óxido nítrico (NO) e a MPO. No intuito de determinar se a ausência de TLR2 influenciaria a produção destes importantes mecanismos microbicidas a produção de NO e atividade de mieloperoxidase foi avaliada. Constatamos uma baixa atividade de mieloperoxidase (MPO) no peritônio de animais TLR2^{-/-} antes e após o desafio com a bactéria. A diminuição na produção de mieloperoxidase pode ter associação direta com o patógeno. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* é uma bactéria catalase positiva, dessa forma é capaz de

degradar o peróxido de hidrogênio e transformá-lo em água. O peróxido de hidrogênio é o substrato necessário para a formação de mieloperoxidase (Lauritsen, 2006). A diminuição dessa enzima, pode estar relacionada à pequena proporção de neutrófilos encontrada no infiltrado ou pela degradação do peróxido de hidrogênio pelos produtos da bactéria. A diminuição na atividade da enzima MPO *in vivo* poderia prejudicar os mecanismos microbicidas iniciais e favorecer o estabelecimento da infecção. Estudos demonstram que neutrófilos estimulados com periodontopatógenos produzem MPO (Taichman *et al.* 1977, Miyasaki *et al.* 1997), e tal enzima se mostra eficiente na morte de diferentes periodontopatógenos, incluindo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Miyasaki *et al.* 1986, Miyasaki. 1991A, Miyasaki *et al.* 1991B); ou mesmo na inativação de sua leucotoxina (Clark *et al.* 1986). Além disso, a presença de MPO em tecidos periodontais doentes tem sido relatada em diversos estudos (Yamalick *et al.* 2000, Liskmann *et al.* 2004).

Nossos resultados também demonstraram uma diminuição da produção de NO por células de animais deficientes de TLR2. Assim, os resultados indicariam que a sinalização via TLR2 influencia a produção de NO após a infecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Uma explicação seria que a ativação da enzima óxido nítrico sintase seria dependente da ativação de TLR2. Outra explicação poderia ser que na ausência da sinalização via TLR2 ocorreria uma diminuição na produção de citocinas que induziriam a ativação da enzima iNOS. Entretanto, a avaliação da produção de citocinas pelas células peritoneais de animais TLR2 não foi realizada, o que não permite descartamos a possibilidade de que a baixa produção de NO seja devido a alterações na produção de citocinas. Em suporte a essa hipótese, dados da literatura sobre a infecção por *P. gingivalis* demonstram que animais TLR2 produzem menos citocinas após o desafio com a bactéria e são mais susceptíveis a infecção. Uma menor produção de NO

e MPO pelos animais nocautes levaria a uma diminuição da resposta protetora contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. De fato, verificamos que na ausência de TLR-2 há uma maior disseminação da bactéria para outros tecidos. Assim, a ausência de TLR poderia favorecer a proliferação e disseminação da bactéria, o que comprova que os mecanismos da resposta imune inicial nos animais nocautes estavam debilitados e a morte ou fagocitose do microorganismo no local de infecção não foram realizados de forma efetiva.

Tais resultados fornecem evidências interessantes a respeito do possível envolvimento de TLR2 no reconhecimento da bactéria e no desenvolvimento da resposta imune inata durante a infecção periodontal. Contudo, os resultados até aqui apresentados não nos permitem analisar o real papel de tais fatores no controle da infecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Nesse sentido, buscando esclarecer o papel de TLR2 na imunomodulação da DP experimental, para tal realizamos a infecção oral com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em camundongos geneticamente modificados para o receptor TLR2.

Verificamos inicialmente que os animais geneticamente deficientes de TLR2 (TLR2^{-/-}), quando infectados com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, apresentaram taxa de sobrevida semelhante aos animais selvagens infectados. Contudo observaram-se diferenças significantes quanto à composição do biofilme. Nossos resultados demonstraram que após a infecção dos animais TLR2 houve uma maior prevalência de *Streptococcus* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* no biofilme formado sobre os molares, diferindo no observado para os animais selvagens onde se observou níveis constantes dos microrganismos estudados. Segundo Teughels *et al.*, 2007 a colonização da cavidade oral com bactérias da família *Streptococcus* (*S. mitis*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*) apresenta efeito inibitório proeminente sobre a colonização com

Aa sobre as células epiteliais. Os resultados indicam que apesar da presença marcante de *Streptococcus spp.* no biofilme dos animais selvagens e TLR2^{-/-}, este microorganismo não foi capaz inibir o estabelecimento de Aa na cavidade oral dos animais (Figura 8).

Como previamente demonstrado (GARLET *et al.*, 2006), a infecção com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leva ao desenvolvimento de um infiltrado inflamatório nos tecidos periodontais de camundongos selvagens (Figura 10), principalmente no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio juncional e nas proximidades da crista óssea alveolar. Além disso, os animais infectados apresentaram um aumento significativo da área compreendida entre a junção amelo-cementária e a crista óssea alveolar, representativa de reabsorção óssea alveolar (Figura 10D).

Em relação aos animais deficientes do receptor TLR2, constatamos inicialmente que na infecção com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* o número de leucócitos nos tecidos periodontais estava significativamente aumentado quando comparado aos animais WT (Figura 10 C e D). Nossos resultados também demonstraram que a reabsorção óssea alveolar estava significativamente aumentada animais TLR2^{-/-} quando comparada aos animais WT (Figura 10D). Houve um aumento da perda óssea nos animais TLR2^{-/-} em função do tempo, sendo mais significativa entre 10 e 60 dias de infecção. A ausência do receptor não influenciou na perda óssea durante o desenvolvimento da imunidade inata (primeiros 3 dias de infecção), mas esta foi significativamente acentuada com o desenvolvimento da resposta imune adaptativa.

Uma possível justificativa para este aumento de perda óssea na fase tardia da infecção pode ser o fato de que a ausência do receptor influenciou na ativação de linfócitos T e B. De fato, estudos recentes têm demonstrado que a ativação de células T reguladoras é dependente da via de sinalização mediada por TLRs (Iwasaki &

Medzhitov, 2004). As células T $CD4^+CD25^+$ com fenótipo regulatório, chamadas comumente de células T reguladoras ou Tregs, estão envolvidas com a supressão e regulação da resposta imune em condições de inflamação e infecção, prevenindo ou atenuando efeitos deletérios de respostas exageradas (Singh *et al.* 2001, Curotto de Lafaille *et al.* 2002, McGuirk *et al.* 2002, Baecher-Allan *et al.* 2004). Embora haja controvérsia quanto a seus mecanismos de ação, acredita-se que possa exercer suas funções de maneira dependente do contato célula-célula através da molécula inibitória CTLA-4, ou através da produção de citocinas, como TGF- β e IL-10 (Curotto de Lafaille *et al.* 2002, Baicher-Allan *et al.* 2004, Sakaguchi *et al.*, 2004). Além da modulação da resposta inflamatória, a produção de citocinas pelas células $CD4^+CD25^+$ é determinante da manutenção do estado de latência em diferentes infecções, facilitando a sobrevivência dos patógenos e possibilitando a reativação da doença (Belkaid *et al.* 2002, Sakaguchi 2004, Mittrucker *et al.* 2004, Abe *et al.* 2004). Assim, uma hipótese plausível para a exacerbação da resposta inflamatória observada nos animais TLR2 com conseqüente aumento da perda óssea possa ser devido à inadequada ativação das células T reguladoras TLR-2, após o desafio com o Aa. Entretanto, essa suposição precisa ser investigada.

Este possível descontrole da resposta imune em animais deficientes de TLR2 com exacerbação da infecção é evidenciado quando analisamos a resposta inflamatória em tecidos periféricos, onde se observa que na ausência de TLR2 há um maior comprometimento de linfonodos, fígado e baço. Estes resultados evidenciam uma maior disseminação da bactéria em animais nocautes, com maior comprometimento de diferentes tecidos periféricos.

Em concordância com nossos resultados, antes de ser reconhecido como periodontopatógeno (Tanner *et al.* 1979), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* era

descrito em lesões cardíacas, pulmonares, cerebrais, urinárias; sendo alvo de diversos estudos nesse sentido (Overholt & Grames. 1966, Townsend & Gillenwater 1969, Muhle *et al.* 1979). Atualmente, devido as possíveis influências sistêmicas da infecção periodontal, tal assunto voltou a ser foco de grande interesse, e diversos estudos tem demonstrado a presença de periodontopatógenos em ateromas, lesões pulmonares e cerebrais, entre outras (Zijlstra *et al.* 1992, Morris *et al.* 1994, Stelzel *et al.* 2002, Paturel *et al.* 2004). Além disso, estudos demonstram que o clone de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* utilizado em nossos estudos, o JP2, é caracterizado pela intensa atividade leucotóxica e pela grande capacidade de invasão tecidual (Henderson *et al.* 2002, Haubek *et al.* 2004, Haubek *et al.* 2004B).

Além da disseminação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em diversos órgãos, nossos resultados demonstraram que a carga bacteriana presente nos tecidos periodontais dos camundongos TLR2^{-/-} era significativamente maior do que nos animais WT (Figura 8). Apesar de não termos observado morte dos animais TLR2 após a infecção oral com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, o aumento da reabsorção óssea-alveolar e da disseminação bacteriana indicam que a ausência deste receptor leva a aumento da suscetibilidade a infecção por esta bactéria.

Os resultados apresentados revelam que a ausência de TLR2 resulta em menores níveis de ativação das células da resposta imune inata (neutrófilos e macrófagos), com maior disseminação da bactéria para tecidos periféricos em um modelo de infecção peritoneal. Os resultados da infecção oral demonstraram que a ausência de TLR2 levou a uma maior susceptibilidade a infecção, com progressiva perda óssea e disseminação da bactéria. Os mecanismos responsáveis por mediar esse fenômeno ainda não foram elucidados, mas serão o alvo de nossas próximas pesquisas, entretanto, como pontuado, eles apontam para um possível envolvimento de um descontrole na resposta imune

adaptativa, provavelmente, por uma ineficiente ativação das células T reguladoras na doença.

Embora exista um vasto conhecimento científico a respeito da patogênese das doenças periodontais, estudos ainda precisam ser realizados para um melhor conhecimento sobre os eventos biológicos envolvidos nesta patologia. Entretanto, o conhecimento sobre o papel dos receptores do tipo Toll na ativação da resposta imune inata e na imunopatogêneses das doenças periodontais poderá servir de base para o direcionamento de novas estratégias de prevenção, assim como o desenvolvimento de novos procedimentos terapêuticos.

- A atividade fagocítica de neutrófilos e macrófagos foram influenciadas pela ausência do receptor TLR2, após o desafio com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*;
- A produção de óxido nítrico e mieloperoxidase foram prejudicadas na ausência de TLR2;
- A infecção oral com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em animais TLR2^{-/-} levou a maior perda óssea quando comparado com os animais controle infectados;
- Ausência de TLR2 favoreceu a disseminação da bactéria para tecidos periféricos;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Genco RJ. Host responses in periodontal diseases: current concepts. *Journal of periodontology*. 1992 Apr;63(4 Suppl):338-55.
- Loesche WT. Bacterial mediators in periodontal disease. *Clin Infect Dis*. 1993 Jun;16 Suppl 4: 203-10.
- AMERICAN DENTAL ASSOCIATION. Periodontal diseases: Pathogenesis and microbial factors. *J Am Dent Assoc*. 1998;129 Suppl:58S-62S.
- Kinane DF, Lappin DF. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol Scand*. 2001 Jun;59(3):154-60.
- AAP. Consensus report. Periodontal diseases: epidemiology and diagnosis. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*. 1996 Nov;1(1):216-22.
- Page RC., Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. A summary of current work. *Lab Invest.*, 1976, 34(3), 235-249.
- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions 1999., 1-6.
- Ebersole JL, Taubman MA. The protective nature of host responses in periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 1994 Jun;5:112-41.
- Susin C, Oppermann RV, Haugejorde O, Albandar JM. Periodontal attachment loss attributable to cigarette smoking in an urban Brazilian population. *J Clin Periodontol*. 2004 Nov;31(11):951-8.
- Yamazaki K, Yoshie H, Seymour GJ. T cell regulation of the immune response to infection in periodontal diseases. *Histology and histopathology*. 2003 Jul;18(3):889-96.
- Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2004;35:21-41.
- Teng YT. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(4):237-52.
- Ebersole JL, Cappelli D, Holt SC. Periodontal diseases: to protect or not to protect is the question? *Acta Odontol Scand*. 2001 Jun;59(3):161-6.
- Page RC. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Ann Periodontol*. 1998 Jul;3(1):108-20.
- Ebersole JL, Cappelli D, Holt SC. Periodontal diseases: to protect or not to protect is the question? *Acta odontologica Scandinavica*. 2001 Jun;59(3):161-6.
- Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*. 2002;28:12-55.
- Sbordone L, Bortolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clinical oral investigations*. 2003 Dec;7(4):181-8.

- Lehner T, Wilton JM, Ivanyi L, Manson JD. Immunological aspects of juvenile periodontitis (periodontosis). *Journal of periodontal research*. 1974;9(5):261-72.
- Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1976 Mar;34(3):235-49.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*. 1999 Dec;4(1):1-6.
- Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 2002;29:177-206.
- Saxe SR, Greene JC, Bohannon HM, Vermillion JR. Oral debris, calculus, and periodontal disease in the beagle dog. *Periodontics*. 1967 Sep-Oct;5(5):217-25.
- Page RC, Schroeder HE. Spontaneous chronic periodontitis in adult dogs. A clinical and histopathological survey. *Journal of periodontology*. 1981 Feb;52(2):60-73.
- Lindhe J, Socransky S, Nyman S, Westfelt E, Haffajee A. Effect of age on healing following periodontal therapy. *Journal of clinical periodontology*. 1985 Oct;12(9):774-87.
- Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*. 1997 Jan;24(1):72-7.
- Ooshima T, Nishiyama N, Hou B, Tamura K, Amano A, Kusumoto A, et al. Occurrence of periodontal bacteria in healthy children: a 2-year longitudinal study. *Community dentistry and oral epidemiology*. 2003 Dec;31(6):417-25.
- Tietze K, Dalpke A, Morath S, Mutters R, Heeg K, Nonnenmacher C. Differences in innate immune responses upon stimulation with gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal of periodontal research*. 2006 Oct;41(5):447-54.
- Sakai VT, Campos MR, Machado MA, Lauris JR, Greene AS, Santos CF. Prevalence of four putative periodontopathic bacteria in saliva of a group of Brazilian children with mixed dentition: 1-year longitudinal study. *International journal of paediatric dentistry / the British Paedodontic Society [and] the International Association of Dentistry for Children*. 2007 May;17(3):192-9.
- Schenkein HA. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2006;40:77-93.
- Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *Journal of clinical periodontology*. 2005;32 Suppl 6:57-71.
- Marshall RI. Gingival defensins: linking the innate and adaptive immune responses to dental plaque. *Periodontology 2000*. 2004;35:14-20.

Dale BA, Fredericks LP. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Current issues in molecular biology*. 2005 Jul;7(2):119-33.

Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, et al. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987 Dec;84(24):9233-7.

Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *Journal of dental research*. 2007 Apr;86(4):306-19.

Attstrom R. The roles of gingival epithelium and phagocytosing leukocytes in gingival defence. *Journal of clinical periodontology*. 1975 Feb;2(1):25-32.

del Fabbro M, Francetti L, Pizzoni L, Weinstein RL. [Congenital neutrophil defects and periodontal diseases]. *Minerva stomatologica*. 2000 Jun;49(6):293-311.

Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral diseases*. 2000 May;6(3):138-51.

Attstrom R. The roles of gingival epithelium and phagocytosing leukocytes in gingival defence. *J Clin Periodontol*. 1975; 2(1):25-32..

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

Zhang, X.; Kluger, Y.; Nakayama, Y.; Poddar, R.; Whitney, C.; Detora, A.; Weissman, S. M.; Newburger, P. E. Gene expression in mature neutrophils: early responses to inflammatory stimuli. *J. Leukoc. Biol*. 2004 75, 358–372.

Takubo, T; Yamane, T; Tsuda, I; Tagawa, S; Tatsumi, N. Polymorphonuclear neutrophils in saliva and blood: a comparative study of morphology, function and phenotype. *British Journal of Biomedical Science*. 54: 260-266, 1997.

Cook, D. N.; Pisetsky, D. S.; Schwartz, D. A. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat. Immunol*. 2004, 5, 975–979.

Sabroe, I.; Parker, L. C.; Wilson, A. G.; Whyte, M. K.; Dower, S. K. Toll-like receptors: their role in allergy and non-allergic inflammatory disease. *Clin. Exp. Allergy* 2002, 32, 984–989.

Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews/ Immunology*. V.6: 173-182: march, 2006.

Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Aug;5(8):577-82.

Belaouaj A. Neutrophil elastase-mediated killing of bacteria: lessons from targeted mutagenesis. *Microbes Infect*. 2002 Oct;4(12):1259-64.

- Mandell, GL. Effect of temperature on phagocytosis by human polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun.* 1975 Jul;12(1):221-3.
- Yamalik N., Cagloyan F, Kiliç A, Tumer C. The importance of data presentation regarding gingival crevicular fluid myeloperoxidase and elastase-like activity in periodontal disease and health status. *J Periodontol.* 2000 Mar;71(3):460-7.
- Liskmann S, et al. correlation of peri-implant health and myeloperoxidase levels: a cross-sectional clinical study. *Clin implants oral res* 2004, oct, 15(5): 546-52.
- Lappin DF, Koulouri O, Radvar M, Hodge P, Kinane DF. Relative proportions of mononuclear cell types in periodontal lesions analyzed by immunohistochemistry. *J Clin Periodontol.* 1999; 26(3):183-9.
- Seymour GJ, Powell RN, Cole KL, Aitken JF, Brooks D, Beckman I, Zola H, Bradley J, Burns GF. Experimental gingivitis in humans. A histochemical and immunological characterization of the lymphoid cell subpopulations. *J Periodontal Res.* 1983 18(4):375-85.
- Adams, D. O. Hamilton, T. A. The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.* 1984 v:2; p. 282-318.
- Nathan, C. F.; Murray, H. W.; Cohn, Z. A. The macrophage as an effector cell. *N. Engl. J. Med.* 1980 303:622-6.
- Pierce, C. W. Macrophages: modulators of immunity. *Am. J. Pathol.* 1980, 98:10-28,.
- Rosenthal, A. S. Regulation of the immune response - role of the macrophage. *N. Engl. J. Med.* 1980 303:1153-6.
- Doherty, T. M. T-cell regulation of macrophage function. *Curr. Opin. Immunol.* 1995 7:400-4.
- Stossel, T. P. Phagocytosis: Recognition and ingestion. *Semin. Hematol.* 1975 12:83-116.
- Stossel, T. P. Phagocytosis. *New Engl. J. Med.* 1974, 290:717-23.
- Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology.* 2001 Oct;2(10):907-16.
- Matejka M, Partykal L, Ulm C, Solar P, Sinzinger H. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1998 Nov;33(8):517-8.
- Lappin DF, MacLeod CP, Kerr A, Mitchell T, Kinane DF. Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. *Clinical and experimental immunology.* 2001 Feb;123(2):294-300.
- Hirose M. et al. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. *J Periodontol.* 2001; 72: 590-597.

- Batista A. Avaliação da expressão da enzima óxido nítrico- sintase induzível (iNOS) em gengivites associadas a placa dentobacteriana e periodontites crônicas localizadas[tese] Bauru, Universidade de São Paulo, 2001
- Wahl SM, Hunt DA, Wong HL, Dougherty S, McCartney-Francis N, Wahl LM, et al. Transforming growth factor-beta is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation. J Immunol. 1988 May 1;140(9):3026-32.
- Yanagita M et al IL-15 up-regulates iNOS expression and NO production by gingival epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Sep 20;297(2):329-34.
- Blix IJ, Helgeland K. LPS from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and production of nitric oxide in murine macrophages J774. Eur J Oral Sci. 1998 Feb;106(1):576-81.
- Giurko R, Mice lacking inducible nitric oxide synthase demonstrate impaired killing of *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun. 2003 Sep;71(9):4917-24.
- Haslett, C.; Savill, J.S.; Whyte, M.K.; Stern, M.; Dransfield, I.; Meagher., L.C. Granulocyte apoptosis and the control of inflammation. Philos. Trans. R. Soc. London . 1994;345:327.
- Gamonal, J.; Bascones, A.; Acevedo, A.; Blanco, E.; Silva, A. apoptosis in chronic adult periodontitis analized by in situ DNA breaks, eletron microscopy and immunohistochemistry. J.Periodontol., 2001, 72: 517-525.
- Green, L.C.; Luzuriaga, K.R.; Wagner, D.A.; RAND, W.; Istan, N.; Young, V.R.; Tannenbaum, S.R. Nitrate biosynthesis in man. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1981. 78: 7764.
- Springer TA.; Thompsom WS; Miller LJ, Schmalstieg PC. Anderson DC. Inherited deficiency of the Mac-1, LFA-1, p150,95 glycoprotein family and its molecular basis. J. exp. Med. 1994, 160: 1901-1918.
- Underhill, D. M.; Ozinsky, A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. Curr. Opin. Immunol.2002 14, 103–110.
- Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. Nat. Rev. Immunol. 2001 1, 135–145.
- Lamaitre, B.; Reichhart, J.M.; Hoffmann, J.A. *Drosophila* host defense:differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94:14614.
- Takeda, K.; Akira, S. Microbial recognition by Toll-like receptors. J. Dermatol. Sci. 2004 34, 73–82.
- Sabroe, I; Parker, LC.; Wilson, AG.; Whyte, MK; Dower, SK. Toll-like receptors: their role in allergy and non-allergic inflammatory disease. Clin. Exp. Allergy 2002 32, 984–989.

Ahmad-Nejad, P.; Hacker, H.; Rutz, M.; Bauer, S.; Vabulas, R. M.; Wagner, H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur. J. Immunol.* 2002 32, 1958–1968.

Heil, F.; Ahmad-Nejad, P.; Hemmi, H.; Hochrein, H.; Ampenberger, F.; Gellert, T.; Dietrich, H.; Llipford, G.; Takeda, K.; Akira, S.; Wagner, H.; Bauer, S. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur. J. Immunol.* 2003 33, 2987–2997.

Matsumoto M.; Funami K.; Tanabe M.; Oshiumi H; Shingai M.; Seto Y; Yamamoto A.; Seya, T. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol.* 2003 171, 3154–3162.

Hayashi, F.; Means, TK.; Luster, AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003 102, 2660–2669.

American Academy of Periodontology. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions., 1-6, 1999.

American Academy of Periodontology. Consensus report : epidemiology and diagnosis . *Ann Periodontol*, 216-222, 1996.

American Dental Association. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *J Am Dent Assoc.*;129 Suppl:58S-62S, 1998.AAP, 1996.

Terpenning MS,Taylor GW, Lopatin DE, Cerr CK, Dominguez BL, Lloesche WJ Aspiration pneumonia: dental and oral risk factors in an older veteran population. *J Am Geriatr Soc.*2001 49(5):557-63.

Shimazaki Y, Soh I, Saito T, YamashitaY, Koga T, Miyazaki H, Takehara T. Influence of dentition status on physical disability, mental impairment, and mortality in institutionalized elderly people. *J Dent Res.*, 2001,80(1):340-5.

Hujoel PP, Drangsholt M, Spiekerman C, Derouen TA Periodontal disease and coronary heart disease risk. *JAMA.* 2000 284(11):1406-10.

Soikkonen K, Wolf J, Salo T, Tilvis R. Radiographic periodontal attachment loss as an indicator of death risk in the elderly. *J Clin Periodontol.* 2000,27(2):87-92.

Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev.*2000,13(4):547-58.

Fowler EB, Breault LG, Cuenin MF. Periodontal disease and its association with systemic disease. *Mil Med.*2001,166(1):85-9.

Beck JD, Pankow J, Tyroler HA, Offenbacher S. Dental infections and atherosclerosis. *Am Heart J.* 1999,138:S528-33.

Meyer DH, Fives-Taylor PM. Oral pathogens: from dental plaque to cardiac disease. *Curr Opin Microbiol.* 19981(1):88-95.

- Dongari-Bagtzoglou AI, Ebersole JL. Gingival fibroblast cytokine profiles in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. J Periodontol 1996; 67(9):871-8.
- Neufert C, Pai K.; Noss EH; Berger M.; Boom WH.; Harding CV. *Mycobacterium tuberculosis* 19-kDa lipoprotein promotes neutrophil activation. J. Immunol. 2001. 167, 1542–1549.
- Trevani AS.; Chorny A; Salamone G; Vermeulen M, Gamberale R, *et al* Bacterial DNA activates human neutrophils by a CpG-independent pathway. Eur. J. Immunol.2003 33, 3164–3174.
- Xiong J, Kang K, Liu L, Yoshida Y, Cooper KD, Ghannoum MA. *Candida albicans* and *Candida krusei* differentially induce human blood mononuclear cell Interleukin-12 and Gamma Interferon production. Infect Immun 2000; 68: 2464-9.
- Vecchiarelli A, Retini C, Monari C, Tascini C, Bistoni F, Kozel TR. Purified capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces interleukin-10 secretion by human monocytes. Infect Immun 1996; 64: 2846-9.
- Parise-Fortes MR, Pereira da Silva MF, Sugizaki MF, Defaveri J, Montenegro MR, *et al* Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. Med Mycol 2000; 38: 51-60.
- Ren L, Leung WK, Darveau RP responses upon stimulation with gram-positive and gram-negative bacteria. J Periodontal Res. 2006 Oct;41(5):447-54.
- Lauritsen NN, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependet and V factor-independent isolates. Intern J Sitem Evolut Microbiol 2006, 56: 2135-2146.
- Scannapieco FA, Millar SJ, Reynolds HS, Zambon JJ, Levine MJ. Effect of anaerobiosis on the surface ultrastructure and surface proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Haemophilus actinomycetemcomitans*). Infect immun 1987, 55: 2320-2323.
- Henderson B, Nair SP, Ward JM, Wilson M. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Ann Rev Microbiol 2003, 57: 29-55.
- Saarela M et al, 1992. Frequency and stability of mono- or poly-infection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, b, c, d or e. Oral Microbiol Immunol. 1992 Oct;7(5):277-9.
- Kaplan JB et al. Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. Infect. Immun 2001: 69: 5375-5384.

- Slots J, Zabon JJ, Rosling BG, Reynolds HS, Christersson LA, Genco RJ. Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease. Association serology, leucotoxycity, and treatment. J Periodontal Res 1982; 17: 447-448.
- Terpenning MS, Taylor GW, Lopatin DE, Kerr CK, Dominguez BL, Loesche WJ. Aspiration pneumonia: dental and oral risk factors in an older veteran population. J Am Geriatr Soc. 2001 49(5):557-63.
- Taichmans S, Iwase M, Korchat H, Berthold P, Lally ET. Membranolytic activity of Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxin. J Periodontal Res. 1991 May;26(3 Pt 2):258-60.
- Fine DH, Kaplan JB, Kachlany SC, Schreiner HC. How we got attached to Actinobacillus actinomycetemcomitans: a model for infectious diseases Periodontol 2000, 2006 46: 114-157, 2006.
- Iwase M, Lally ET, Berthold P, Korchak HM, Taichman NS. Effects of cations and osmotic protectants an cytolytic activiy of Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxin. Infect Immun 1990;58: 1782-1788.
- Asakawa R, Komatsuzawa H, Kawai T, Yamada S, Gonçalves RB *et al.* Outer membrane protein 100, a versatile virulence factor of Actinobacillus actinomycetemcomitans. Mol Microbiol 2003; 50: 1125-1139.
- Purdy D, Buswell CM, Hodgson AE, McAlpine K, Henderson I, Leach SA. Characterisation of cytolethal distending toxin (CDT) mutants of Campylobacter jejuni. J Med Microbiol. 2000 May;49(5):473-9
- Shenker BJ, Vitale LA, Welham DA. Immune supression induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans effects on immunoglobulin production by human B cells. Infect immun, 1990; 58: 3856-3862.
- Spitznagel J Jr. et al,. Regulation of leucotoxin in leukotoxic and nonleukotoxic strains of A. actinomycetmcomitans. Infect. Immun 1991.
- Haubek D et al. The highly leukotoxic JP2 clone Actinobacillus actinomycetemcomitans and progresssion of periodontal attachment loss. j dent Res. 2004. 83: 767-770.
- Saito T, Marakami M, Shimazaki Y, Oobayashi K, Matsumoto S, Koga T. Association between alveolar bone loss and elevated serum C-reactive protein in Japanese men. J Periodontol. 2003 Dec;74(12):1741-6.
- Wilson M, Henderson B. Virulence factors of Actinobacillus actinomycetemcomitans relevant to the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. FEMS Microbiol Rev. 1995 Dec;17(4):365-79.
- Fives-Taylor P. Meyer D, Mintz K. Characteristics of Actinobacillus actinomycetemcomitans invasion of and adhesion to cultured epithelial cells. Adv Dent Res. 1995 Feb;9(1):55-62.

- Fives-Taylor Pm, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol* 2000. 1999 Jun;20:136-67.
- Permpaich P, Kowolik MJ, Galli DM. Resistance of fluorescent-labelled *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains to phagocytosis and killing by human neutrophils. *Cell Micro*. 2006, 8(1) 72-84.
- Elahi S, Pang G, Ashman R, Clancy R Nitric oxide-enhanced resistance to oral candidosis. *Immunology* 2001 104: 447-454.
- Takeuchi O. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol*. 2000 Jan;12(1):113-7.
- Villamón E. et al. Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microbes Infect*. 2004 Jan;6(1):1-7.
- Rodriguez N. Differential involvement of TLR2 and TLR4 in host survival during pulmonary infection with *Chlamydia pneumoniae*. *Eur J Immunol*. 2006 May;36(5):1145-55.
- Gasparoto T H, Gaziri L C J, Burger E, Almeida R S C, Felipe I (2004) Apoptosis of phagocytic cells induced by *Candida albicans* and production of IL-10. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 42: 219- 224.
- Hirche TO, Gaut JP, Heineche JW, Belaaouaj A.. Myeloperoxidase plays critical roles in killing *Klebsiella pneumoniae* and inactivating neutrophil elastase: effects on host defense. *J Immunol*. 2005 Feb 1;174(3):1557-65.
- Klebanoff, SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*. 2005 May;77(5):598-625. Epub 2005 Feb 2.
- Simmonds RS. Dental caries and the microbial ecology of dental plaque: a review of recent advances. *N Z Dent J*. 2000 Jun;96(424):44-9.
- van Winkelhof AJ. & Slots J *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. *Periodontol* 2000. 1999 Jun;20:122-35.
- Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, 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 microbiology and immunology*. 2006 Feb;21(1):12-20.
- Kikkert R, Laine ML, Aaide LA, van Winkelhof AJ. Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Jun;22(3):145-51.
- Ricote M, Valledon AF, Glass CK. Decoding transcriptional programs regulated by PPARs and LXRs in the macrophage: effects on lipid homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Feb;24(2):230-9.

- Silva TA, Garlet GP, Lara VS, Martins W Jr, Silva JS, Cunha FQ. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *Oral Microbiol Immunol*. 2005 Oct;20(5):310-6.
- Suzuki T, Kobayashi M, Isatsu K, Nishihara T, Aiuchi T, Nakaya K. Mechanisms involved in apoptosis of human macrophages induced by lipopolysaccharide from *A. actinomycetemcomitans* in the presence of cycloheximide. *Infect Immunol*, 2004 Apr 1856-1865.
- Blander JM, Medzhitov R. On regulation of phagosome maturation and antigen presentation. *Nat Immunol*. 2006 Oct;7(10):1029-35.
- De Luca A, Montagnoli C, Zelante T, Bonifazi P, Bozza S, Moretti S, D'Angelo C, Vacca C, Boon L, Bistoni F, Puccetti P, Fallarino F, Romani L. Functional yet balanced reactivity to *Candida albicans* requires TRIF, MyD88, and IDO-dependent inhibition of Rorc. *J Immunol*. 2007 Nov 1;179(9):5999-6008.
- Taichman NS, Tsai CC, Baehni PC, Stoller N, McArthur WP. Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. IV. In vitro release of lysosomal constituents from polymorphonuclear leukocytes exposed to supragingival and subgingival bacterial plaque. *Infect Immun*. 1977 Jun;16(3):1013-23.
- Miyasaki KT, Iofel R, Lehrer RI. Sensitivity of periodontal pathogens to the bactericidal activity of synthetic protegrins, antibiotic peptides derived from porcine leukocytes. *J Dent Res*. 1997 Aug;76(8):1453-9.
- Miyasaki KT, Wilson ME, Genco RJ. Killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by the human neutrophil myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system. *Infect Immun*. 1986 Jul;53(1):161-5.
- Miyasaki KT. The neutrophil: mechanisms of controlling periodontal bacteria. *Periodontol*. 1991 Dec;62(12):761-74.
- Miyasaki KT, Bodeau AL, Flemmig TF. Differential killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Capnocytophaga* spp. by human neutrophil granule components. *Infect Immun*. 1991 Oct;59(10):3760-7.
- Clark RA, Leidal KG, Taichman NS. Oxidative inactivation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin by the neutrophil myeloperoxidase system. *Infect Immun*. 1986 Aug;53(2):252-6.
- Yamalik N, Çağlayan F, Kiliç K, Kiliç A, Tümer C. The importance of data presentation regarding gingival crevicular fluid myeloperoxidase and elastase-like activity in periodontal disease and health status. *J Periodontol*. 2000 Mar;71(3):460-7.
- Liskmann S, Zilmer M, Vihalemm T, Salum O, Fischer K. Correlation of peri-implant health and myeloperoxidase levels: a cross-sectional clinical study. *Clin Oral Implants Res*. 2004 Oct;15(5):546-52.
- Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunol* 2004 Oct 5(10): 987-995.

- Singh B, Powrie F, Mortensen NJ. Immune therapy in inflammatory bowel disease and models of colitis. *Br J Surg*. 2001 Dec;88(12):1558-69.
- Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr Opin Immunol*. 2002 Dec;14(6):771-8.
- McGuirk P, Mills KH. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol*. 2002 Sep;23(9):450-5.
- Baecher-Allan C, Hafler DA. Suppressor T cells in human diseases. *J Exp Med*. 2004 Aug 2;200(3):273-6.
- Sakaguchi M, Sonegawa H, Nukui T, Sakaguchi Y, Miyazaki M, Namba M, Huh NH. Bifurcated converging pathways for high Ca²⁺- and TGFbeta-induced inhibition of growth of normal human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 27;102(39):13921-6.
- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature*. 2002 Dec 5;420(6915):502-7.
- Mittrücker HW, Kaufmann SH. Mini-review: regulatory T cells and infection: suppression revisited. *Eur J Immunol*. 2004 Feb;34(2):306-12.
- Abe K, Kadota J, Ishimatsu Y, Iwashita T, Tomono K, Kawakami K, Kohno S. Th1-Th2 cytokine kinetics in the bronchoalveolar lavage fluid of mice infected with *Cryptococcus neoformans* of different virulences. *Microbiol Immunol*. 2000;44(10):849-55.
- Tanner AC, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol*. 1979 Oct;6(5):278-307.
- Overholt EL, Grames GM. Gram-negative septicemia. *Mil Med*. 1964 Dec;129:1181-5.
- Townsend TR, Gillenwater JY. Urinary tract infection due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *JAMA*. 1969 Oct 20;210(3):558.
- Muhle I, Rau J, Ruskin J. Vertebral osteomyelitis due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *JAMA*. 1979 Apr 27;241(17):1824-5.
- Zijlstra EE, Swart GR, Godfroy FJ, Degener JE. Pericarditis, pneumonia and brain abscess due to a combined *Actinomyces*--*Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. *J Infect*. 1992 Jul;25(1):83-7.
- Morris JF, Sewell DL. Necrotizing pneumonia caused by mixed infection with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinomyces israelii*: case report and review. *Clin Infect Dis*. 1994 Mar;18(3):450-2.
- Stelzel M, Conrads G, Pankuweit S, Maisch B, Vogt S, Moosdorf R, Flores-de-Jacoby L. Detection of *Porphyromonas gingivalis* DNA in aortic tissue by PCR. *J Periodontol*. 2002 Aug;73(8):868-70.

Paturel L, Casalta JP, Habib G, Nezri M, Raoult D. Actinobacillus actinomycetemcomitans endocarditis. Clin Microbiol Infect. 2004 Feb;10(2):98-118.

Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Benzarti N, Baelum V. The highly leukotoxic JP2 clone of Actinobacillus actinomycetemcomitans and progression of periodontal attachment loss. J Dent Res. 2004 Oct;83(10):767-70.

Haubek D, Westergaard J. Detection of a highly toxic clone of Actinobacillus actinomycetemcomitans (JP2) in a Moroccan immigrant family with multiple cases of localized aggressive periodontitis. Int J Paediatr Dent. 2004 Jan;14(1):41-8.