**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

HELITON GUSTAVO DE LIMA

**MECANISMOS DE DEFESA DOS MASTÓCITOS
CONTRA O PERIODONTOPATÓGENO
AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS:
ATIVIDADE MICROBICIDA INTRACELULAR**

**BAURU
2015**

HELITON GUSTAVO DE LIMA

**Mecanismos de defesa dos mastócitos contra o
periodontopatógeno *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*:
atividade microbicida intracelular**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Patologia Bucal.

Orientadora: Profa. Dra Vanessa Soares Lara

Versão corrigida

BAURU
2015

L628m Lima, Heliton Gustavo
Mecanismos de defesa dos mastócitos contra o
periodontopatógeno *Aggregatibacter*
actinomycetemcomitans: atividade microbicida
intracelular / Heliton Gustavo de Lima. – Bauru,
2015.
119 p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia
de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Soares Lara

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 02/2013
Data: 18/02/2013

DADOS CURRICULARES

HELITON GUSTAVO DE LIMA

Nascimento	31/12/1987. Rolândia - PR.
Filiação	Jurandir Alves de Lima. Maria Aparecida Alves de Lima (<i>in memoriam</i>).
2005-2009	Graduação em Odontologia. Universidade do Norte do Paraná.
2009-2011	Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas. Área de concentração: Patologia Bucal - Faculdade de Odontologia de Bauru-USP.
2011-2015	Doutorado em Ciências Odontológicas Aplicadas. Área de concentração: Patologia Bucal - Faculdade de Odontologia de Bauru-USP.
Associação	SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Maria Aparecida Alves de Lima (in memoriam). Ela que sempre me incentivou a perseguir meus sonhos e que, muitas vezes, abdicou os dela para me fazer feliz. Certamente, estou realizando um dos maiores sonhos que cultivamos juntos: tornar-me doutor.

*Por que Deus permite
Que as mães vão-se embora?*

Mãe não tem limite

É tempo sem hora

Luz que não apaga

Quando sopra o vento

E chuva desaba

Veludo escondido

Na pele enrugada

Água pura, ar puro

Puro pensamento

Morrer acontece

Com o que é breve e passa

Sem deixar vestígio

Mãe, na sua graça

É eternidade

Por que Deus se lembra

- Mistério profundo -

De tirá-la um dia?

Fosse eu rei do mundo

Baixava uma lei:

Mãe não morre nunca

Mãe ficará sempre

Junto de seu filho

E ele, velho embora

Será pequenino

Feito grão de milho

Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, razão da minha existência e que me constrange com o seu amor incondicional. Ele é o maior responsável por essa conquista, sempre me concedendo força, sabedoria, esperança, serenidade e, acima de tudo, saúde, imprescindíveis para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho!

À minha mãe, **Maria Aparecida Alves de Lima** (in memoriam), exemplo de garra, coragem e fé. Jamais se curvou em meio às tribulações, sem dúvida foi minha maior incentivadora e conselheira em tudo. Sou muito grato a Deus por este “baita” presente que Ele me deu.

Ao meu pai, **Jurandir Alves de Lima**, homem trabalhador, dócil e brincalhão que demonstra de modo particular todo seu imenso amor. Agradeço pela segurança que você sempre me proporcionou e pelo exemplo de bondade e honestidade.

Ao meu irmão **Helton Júnior de Lima** por todo apoio nestes anos de estudo, tenho plena consciência o quanto você colaborou para que meus sonhos se tornassem realidade.

Ao meu querido sobrinho **Gabriel Germano de Lima** que me enche de alegria com seu doce olhar inocente. Você é um dos presentes mais lindos que Deus me deu nesses últimos anos. O tio ama você!

À minha cunhada **Rosângela Germano de Lima** por cuidar com tanta dedicação e carinho de bens tão valiosos para mim. Agradeço a Deus por ter te colocado em nossa família.

A todos meus familiares em especial **Tia Noadi Dias**, que cuidou com grande amor e zelo da casa, do pai e do tio Edinaldo. Sou eternamente grato

*pela sua dedicação. **Tio Edinaldo Alves de Lima**, por todos os momentos de descontração e **Tia Eva Casturina Alves** por todo carinho.*

*À minha adorável madrinha e segunda mãe **Madalena Huss**, por todo colo de mãe que me oferece em nossas longas conversas. Tê-la como madrinha foi um grande presente que Deus me deu. Obrigado por tudo.*

*À minha querida prima, amiga e irmã **Claudia Alves de Lima**, por todo companheirismo, carinho e respeito. Tenho grande admiração por você. Que nossa amizade seja eterna.*

À minha querida orientadora **Profa. Dra. Vanessa Soares Lara**, que muito me ensinou durante esses seis anos de convivência. Ensinaamentos que servirão para a vida toda e que não se resumem apenas ao âmbito profissional, mas também ao pessoal. Vou sentir saudades dos momentos que presenciei seu brilhantismo na microscopia, ao fechar diagnósticos de casos complexos; sua excelente capacidade de raciocínio lógico e senso crítico em discutir resultados, essas e outras competências a torna uma excelente profissional. Agradeço imensamente por ter apostado e confiado em meu potencial. Tê-la como orientadora e amiga foi um frutuoso presente que Deus me deu. Muito obrigado pelo carinho, atenção e paciência.

Aos professores da Disciplina de Patologia da FOB, **Dr. Luís Antônio de Assis Taveira**, obrigado pelos ensinamentos e pelos momentos de descontração vividos na Patologia e em Congressos, **Dra. Denise Tostes Oliveira**, agradeço imensamente a todos os conselhos e ensinamentos que contribuíram para minha maturidade acadêmica e **Dr. Alberto Consolaro** pelos saberes compartilhado e pela harmoniosa convivência.

À querida amiga **Dra. Camila Peres Buzalaf** que atuou como colaboradora no desenvolvimento deste trabalho. Sou extremamente grato por sua solicitude, sempre esclarecendo dúvidas e ajudando a definir protocolos. Saiba que você foi peça fundamental na minha formação profissional. Palavras não definem o grande carinho que tenho por você. Sou grato a Deus pela sua amizade.

À querida amiga e irmã **Karen Henriette Pinke** com quem compartilho minhas alegrias, dificuldades e anseios desde o mestrado. Foi com você que dei meus primeiros passos na cultura celular. Muito obrigado por ter feito os meus dias de doutorado mais emocionantes. Agradeço a Deus pela sua vida e por nossa irmandade, pois são poucas as pessoas que têm a felicidade de desfrutar um relacionamento tão intenso e amoroso no ambiente profissional, e que esta parceria seja eterna, amo você!

Ao Prof. **Dr. Mario Júlio Ávila-Campos**, do Laboratório de Anaeróbios do ICB/USP, que nos disponibilizou as cepas bacterianas, ATCC 29523 e (EIEC) 0:124, utilizadas no desenvolvimento de nossos estudos.

Ao **Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha** do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- FMRP-USP, e às **Profas. Dra. Maria Célia Jamur e Constance Oliver**, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular dos Mastócitos da FMRP-USP que abriram as portas dos seus respectivos laboratórios, sanando todas as dúvidas referentes à cultura de mastócitos, além de nos conceder reagentes para viabilização deste trabalho.

Ao **Dr. Jordan Wesolowski** que colaborou com dicas e sugestões fundamentais para padronizarmos o CFU e assim analisarmos a atividade microbica intracelular de mastócitos e macrófagos. Obrigado pelo profissionalismo e atenção!

À **Profa. Dra. Ana Paula Campanelli** por toda disponibilidade e atenção em nos receber nas dependências do Departamento de Ciências Biológicas, disciplina de Microbiologia, para utilização do citômetro, possibilitando realizarmos a análise dos ensaios de apoptose.

À querida amiga **Dra Thaís Helena Gasparoto** que me ensinou a interpretar os resultados obtidos no citômetro, referente aos ensaios de apoptose. Obrigado pelo carinho, simpatia e os momentos de desabafo compartilhados. Admiro você como pessoa e pesquisadora!

Ao **Dr. Devandir de Souza Junior** da FMRP-USP, que nos ajudou no esclarecimento de protocolos respondendo nossos milhares de e-mails, sendo sempre muito solícito e atencioso conosco. Muito obrigado!

Ao **Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris**, pelos ensinamentos e colaboração na realização das análises estatísticas.

Ao querido amigo **Renan Lima Dario**, pela solicitude em esclarecer dúvidas referentes a cálculos realizados no capítulo de resultados da tese.

Aos **Professores Dr. Vinícius Carvalho Porto e Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira**, por todo apoio e incentivo além de permitir a utilização dos equipamentos do Centro Integrado de Pesquisa (CIP).

Aos queridos funcionários do CIP: **Marcelo Milanda** pela diligência em preparar as cepas bacterianas para os experimentos. Além disso, foi meu braço direito na padronização e execução do CFU. Obrigado pela parceria! **Ms. Rafaela Alves da Silva Alavarce, Ms. Márcia Sirlene Z. Graeff, Neusa Caetano Barbosa e Renato Pereira Murback**, obrigado pelo carinho, e por tornarem minhas horas de trabalho laboratoriais mais agradáveis.

Aos funcionários e ex-funcionários da Patologia **Maria Cristina Carrara Filippi, Fátima Aparecida Silveira e Marina dos Santos Corrêa**, que me proporcionaram grandes momentos de alegria e descontração. Obrigado por fazer meus dias em Bauru mais felizes.

À querida amiga bibliotecária **Milene Andrigueti de Souza** por me ajudar na solicitação de artigos via COMUT, além de colaborar na formatação e referências bibliográficas da tese.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, em especial na pessoa de **Luiz Carlos da Silva**, colaborador no andamento da pesquisa.

A **todos os funcionários da FOB-USP** que colaboraram de forma direta ou indireta no desenvolvimento deste trabalho.

Aos **graduandos da turma L** que através do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) pude adquirir uma experiência única em sala de aula e no laboratório, o meu muito obrigado.

Aos professores do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba FOA-UNESP: **Cristiane Furuse, Marcelo Macedo Crivelini, Renata Callestini Felipini e Ana Maria Pires Soubhia**, por todas as experiências compartilhadas. Agradeço pela oportunidade e confiança. Certamente foi uma fase muito enriquecedora na minha carreira profissional. Aprendi muito com vocês!

Ao **Dr. Cléverson Teixeira Soares** pelos ensinamentos e proveitosas discussões de casos clínicos.

À **Profa. Dra. Linda Wang** querida amiga que sempre acreditou no meu potencial, fazendo com que eu jamais desistisse do sonho da carreira acadêmica. Obrigado por tudo!

À **Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade** pela amizade e grande carinho e incentivo. Obrigado por sempre acreditar em mim.

À **Prof. Dra. Sandra Mara Maciel**, professora querida e paciente, minha primeira mãe científica que me incumbiu à arte de querer pesquisar. Tenho saudades dos nossos quatro anos de convivência.

Às queridas amigas, **Adriana Caetano, Priscila Tobouti, Fernanda Pigatti e Maria Carolina Mussi**, apesar da distância sempre levo a cada uma em meu coração. Como foi bom tê-las perto de mim, sei que nossas amizades serão para vida toda.

À querida amiga **Ana Regina Casaroto**, pessoa admirável e de grande bondade. Ofereceu seu ombro amigo em momentos muito difíceis que precisei. Juntos, nestes anos de pós-graduação, passamos por muitas histórias que ficarão na lembrança. Agradeço a Deus pela sua amizade.

*Aos queridos amigos da Patologia **Agnes Assao, Kellen Cristine Tjioe, José Burgos Ponce, Taiane Priscila Gardizani, Rafaela Alves da Silva Alavarce, Felipe Alavarce de Oliveira, Nara Lígia Martins Almeida e Eliane Ferraz da Costa** obrigado pelos momentos de descontração, alegria e desabafos. Vocês fizeram este doutorado valer a pena. Sentirei saudades, mas que a parceria seja longa e duradoura. Obrigado!*

*Às amigas e companheiras de trabalho do CIP: **Flávia Amadeu de Oliveira, Priscila Maria Aranda Salomão, Adriana Arruda Matos, Cintia Kazuko Tokuhara, Mariana Rodrigues Santesso, Talita Ventura, Gabriela Silva Neubern de Oliveira**, alunas da pós-graduação da Bioquímica, obrigada pelos momentos de alegria e descontração. Vocês tornaram os dias de experimento muito mais agradáveis.*

*A todos os colegas de pós-graduação da área de Patologia: **Alexandre Simões Garcia, Ana Paula Madi, Bruna Maria Rodrigues Vilardi, Carine Ervolino de Oliveira, Diego Mauricio Bravo Calderón, Eloisa Marchi dos Anjos Soria, Erika Sinara Lenharo Orti-Raduan, Francisco Barbara Abreu de Barros, Maria Carolina Vaz Goulart, Mariana Rates Gonzaga Santos, Natália Galvão Garcia, Simone Faustino, Sylvie Brener, Taísa Maria Rodrigues Vilardi e Paula Nascimento** pelos bons momentos compartilhados.*

*Aos queridos amigos da pós-graduação de outras áreas e instituições que conheci no decorrer destes anos de mestrado e doutorado: **Samira Salmeron, Elen de Souza Tolentino, Camila Lopes Cardoso, Kellen Cristina da Silva Gasque, Thaís Sumie Nozu Imada, Magda Paula Pereira do Nascimento, Lidiane Yumi Sawasaki, Cristiane Alves Paz de Carvalho, Fábio Silva de Carvalho, Raquel Miden Mesquita, Layla Reginna Silva Munhoz de Vasconcelos, Maria Cristina Carvalho de Almendra Freitas, Rafaela Nunes, Paula Stephania Brandao Hage Karam, Paula Cunha, Maria Alejandra Frias, Rafael Ferreira, Isabela Tomazini Sabino, Diana Conceição da Rocha, Claudia Cristina Bigueti, Andreia Espíndola Vieira, Carlos Eduardo Palanch Repeke, Elcia Maria Varize Silveira, Lucas Eduardo Botelho de Souza, Hariane Côco e Ana Cardoso** obrigado por todo companheirismo, carinho e amizade.*

À querida amiga **Melissa Wakayama Nomiyama**, por toda harmoniosa convivência nos experimentos laboratoriais. Tenha plena certeza que você contribuiu e muito para minha formação como docente.

Aos meus queridos **amigos de XV turma de Odontologia da UNOPAR**, os quais eu convivi quatro anos de intenso aprendizado e descontração.

À querida amiga **Ernna Hérída Domingues de Oliveira**, amizade feita em Glasgow-Scotland e que se manteve em terras brasileiras. Obrigado por todo carinho, momentos de desabafo e descontração.

Ao querido amigo, **Murilo Cantu Ortega**, obrigado por compartilhar comigo os últimos dois anos de moradia em Bauru, os quais foram preenchidos por muitos momentos de alegria, conversas e guloseimas. Agradeço a delicadeza e compreensão nos momentos difíceis. Você vai ficar guardado pra sempre no meu coração.

A **todos os professores e funcionários do Colégio Estadual Professor Francisco Villanueva**, em que participaram da minha formação, no período de 1993 à 2004. Agradeço imensamente a todos os ensinamentos. Certamente este título de doutor não teria sentido sem vocês.

A todos os meus queridos **amigos da cidade de Rolândia** que me incentivaram e apoiaram nesta tomada de decisão em abandonar tudo para lutar por este sonho acadêmico em Bauru.

A todos os **amigos do Ministério Universidades Renovadas (MUR) e do grupo de Jovens SCJ**, em que convivi momentos de muita alegria, oração e missão. Sou extremamente grato a Deus por cada amizade formada nestes grupos. Com vocês os meus dias em Bauru tiveram muito mais “graça”.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

*À Faculdade de Odontologia de Bauru – USP na pessoa da excelentíssima diretora **Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.***

*À Comissão da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa do Presidente, **Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson.***

*Ao Curso de Pós-graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas, na Área de Concentração em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP na pessoa de **Prof. Dra. Denise Tostes Oliveira,** responsável por esta área.*

*Ao Departamento de Estomatologia, da FOB/USP, na pessoa do chefe **Prof. Dr. Osny Ferreira Júnior.***

*Ao Centro Integrado de Pesquisa (CIP), na pessoa do ex-coordenador **Prof. Vinícius Carvalho Porto** e do atual coordenador **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira,** pela autorização de acesso às dependências para o desenvolvimento deste trabalho.*

*À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES), pela concessão de minha bolsa de Doutorado.*

*À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP), pelos auxílios à pesquisa (2009/14152-1; 2011/17481-6; 2012/12458-9), possibilitando a obtenção de reagentes para a realização deste trabalho.*

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que a minha trajetória pelo doutorado se tornasse mais prazerosa e proveitosa, meus sinceros e eternos agradecimentos!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Os mastócitos (MCs) estão presentes tanto no periodonto normal quanto inflamado, em diferentes quantidades e em vários locais. Nos últimos anos, a eficácia e a contribuição dos MCs em eliminar bactérias, através de sua atividade microbicide intracelular, estão se tornando cada vez mais reconhecidas. Assim, a partir de MCs murinos desafiados in vitro com o periodontopatógeno *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29523) por 3, 5, 10 e 24 horas, o presente estudo teve como objetivo investigar a capacidade microbicide intracelular de MCs, e comparar com a capacidade microbicide de macrófagos peritoneais murinos (MPs), considerados fagócitos profissionais, por meio da contagem das unidades formadoras de colônias. Além disso, avaliou-se a produção e liberação de mediadores microbicidas, óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), por meio do método colorimétrico de Griess e pela degradação de substratos fluorescentes, respectivamente. Para a análise estatística, foram utilizados os testes estatísticos ANOVA Fatorial seguido do teste de Tukey e teste de correlação de Pearson ($p < 0.05$). Nossos resultados revelaram que os MCs foram capazes de eliminar eficientemente o periodontopatógeno, principalmente após 10h de desafio intracelular. Comparando-se a atividade microbicide dos dois tipos celulares, verificou-se, nos períodos de 3h e 5h de desafio, um menor percentual de colônias viáveis no interior de MPs, em comparação aos MCs. Inversamente, nos períodos de 10h e 24h, observaram-se menores valores percentuais de colônias intracelulares nos MCs em relação aos MPs. Além disso, a produção/liberação de NO bem como, em menor proporção, de H₂O₂ pelos MCs foram concordantes com a sua capacidade microbicide. Este é o primeiro estudo que demonstra a eficiente ação microbicide intracelular de MCs murinos contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, com produção e liberação de substâncias potencialmente bactericidas, e de forma mais eficaz que os macrófagos. Esses resultados sugerem a importância dessas células nos mecanismos de defesa presentes na doença periodontal induzida por placa dentobacteriana.

Palavras-chave: Mastócitos. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Doença periodontal. Óxido nítrico. Peróxido de Hidrogênio.

ABSTRACT

Defense mechanisms of mast cells against periodontopathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: intracellular microbicidal activity

Mast cells (MCs) are present in both normal and inflamed periodontal tissues, in varying amounts and locations. Recently, MCs contribution in eliminating bacteria and its effectiveness, through its intracellular microbicidal activity, have been increasingly recognized. Thus, this study aimed to investigate the intracellular microbicidal capacity of MCs, and compare it with the microbicidal capacity of murine peritoneal macrophages (MPs), considered professional phagocytes, by counting the colony forming units. Both cell types were challenged in vitro with periodontopathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29523) by 3, 5, 10 and 24 hours. Additionally, the production and release of microbicidal agents, nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide (H₂O₂) were evaluated by means of colorimetric Griess method and by the degradation of fluorescent substrates, respectively. Statistical analysis was performed by ANOVA Factorial test followed by Tukey and Pearson's correlation test ($p < 0.05$). Our results revealed that MCs are able to efficiently eliminate periodontopathogen, mainly after 10 hours of intracellular challenge. The microbicidal activity of both cell types, in 3 and 5 hours of challenge showed a lower percentage of viable colonies inside MPs, compared to MCs. Contradictorily, in 10 and 24 hours a lower percentage of intracellular colonies in MCs was observed in relation to MPs. Moreover, the production/release of NO and, in minor proportion, of H₂O₂ by MCs was in agreement with its microbicidal capacity. Therefore, this is the first report to describe the intracellular microbicidal activity of murine MCs against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, concerning production and release of potentially bactericidal substances, which is more effective than macrophages. These results suggest the importance of these cells in pathogenesis and defense mechanisms of biofilm-associated periodontal disease.

Key words: Mast cells. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Periodontal Diseases. Nitric Oxide. Hydrogen Peroxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Caracterização morfológica e imunofenotipagem dos mastócitos murinos.....	62
Figura 2 - Percentual de BMMCs Anexina V ⁺ (A) ou Anexina V ⁺ e Iodeto de Propídio ⁺ (Anexina PI ⁺) (B), por 28 horas (CTRL – não desafiados), após o tempo de fagocitose de 1 hora (FAG), e após o desafio intracelular com <i>A. actinomycetemcomitans</i> (A.a.) por 3, 5, 10 e 24 horas.....	64
Figura 3 - Percentual de MPs Anexina V ⁺ (A) ou Anexina V ⁺ e Iodeto de Propídio ⁺ (Anexina PI ⁺) (B), não desafiados por 28 horas (CTRL), após o tempo de fagocitose de 1 hora (FAG), e após o desafio intracelular com <i>A. actinomycetemcomitans</i> (A.a.) por 3, 5, 10 e 24 horas.....	66
Figura 4 - Média ± desvio padrão do percentual de colônias viáveis de <i>A. actinomycetemcomitans</i> (A) ou de <i>E. coli</i> (B) no interior de BMMCs após 3, 5, 10 e 24 horas de desafio intracelular, subsequente a um período de fagocitose de 1 hora.....	68
Figura 5 - Média ± desvio padrão do percentual de colônias viáveis de <i>A. actinomycetemcomitans</i> (A) ou de <i>E. coli</i> (B) no interior de MPs após 3, 5, 10 e 24 horas de desafio intracelular, subsequente a um período de fagocitose de 1 hora.....	70
Figura 6 - Comparação da capacidade microbicida intracelular contra <i>A. actinomycetemcomitans</i> , entre os dois tipos celulares.....	71
Figura 7 - Colônias viáveis de <i>A. actinomycetemcomitans</i> na presença ou ausência de BMMCs.....	74
Figura 8 - Colônias viáveis de <i>A. actinomycetemcomitans</i> na presença ou ausência de MPs.....	77

Figura 9 - Produção intracelular e liberação de óxido nítrico por BMMCs estimulados ou não.....	79
Figura 10 - Produção intracelular e liberação de óxido nítrico por MPs estimulados ou não.....	81
Figura 11 - Liberação de peróxido de hidrogênio por BMMCs (A) ou MPs (B) estimulados ou não.....	83
Figura 12 - Correlação entre produção/liberação de mediadores microbicidas pelos BMMCs desafiados com <i>A. actinomycetemcomitans</i> e o percentual de colônias viáveis, desta bactéria, no interior de BMMCs.....	85
Figura 13 - Correlação entre produção/liberação de mediadores microbicidas pelos MPs desafiados com <i>A. actinomycetemcomitans</i> e o percentual de colônias viáveis, desta bactéria, no interior de MPs.....	87

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

°C	graus Celsius
µg/mL	microgramas por mililitro
µL	microlitro
µM	micromolar
A.a	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BMMCs	<i>Bone Marrow Mast Cells</i> (mastócitos derivados da medula óssea)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (albumina bovina sérica)
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (grupamento de diferenciação)
CO ₂	Dióxido de carbono (gás carbônico)
DNA	Desoxiribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorted</i> (citometria de fluxo)
FcεRI	Receptor de alta afinidade para imunoglobulina E
FITC	Fluoresceína isoticianato
g	gramas
HTI	Hipersensibilidade do tipo imediata
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
INPM	Instituto Nacional de Pesos e Medidas
LL-37	Catelicidina LL-37
LPS	Lipopolissacarídeos
MCs	Mastócitos
mg/L	miligrama por litro
mL	mililitro
MPs	Macrófagos Peritoneais
ng/mL	nanogramas por mililitros
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido Nítrico

NOD	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain Receptors</i> (receptores de domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos)
O ₂	Oxigênio
<i>p</i>	Nível de Significância
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (tampão fosfato-salina)
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i> (Acetato de Miristato de Forbol)
pg/mL	picogramas por mililitros
pH	potencial de Hidrogênio iônico
rpm	rotação por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultura)
SCF	Stem Cell Fator (Fator de Células Tronco)
SFB	Soro Fetal Bovino
Th	T helper (T auxiliar)
TLR	<i>Toll like</i> receptor (receptor do tipo <i>Toll</i>)
TNF- α	<i>Tumoral necrosis factor alpha</i> (fator de necrose tumoral alfa)
UFC	Unidade formadora de colônia
xg	Veze o valor da gravidade

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcento
°	grau
>	maior
≤	menor ou igual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	31
3	PROPOSIÇÃO.....	41
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1	Animais de experimentação.....	47
4.2	Isolamento, diferenciação e expansão dos mastócitos.....	47
4.3	Diferenciação e Caracterização de Mastócitos Murinos.....	48
4.4	Obtenção e cultura de macrófagos peritoneais de camundongos.....	49
4.5	Cultura de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> e <i>Escherichia coli</i> ...	51
4.6	Apoptose de BMMCs e MPs frente ao desafio de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	52
4.7	Atividade microbida intracelular de BMMCs através da determinação das unidades formadoras de colônia (UFC).....	53
4.8	Produção intracelular e liberação de Óxido Nítrico pelos BMMCs e MPs após desafio com <i>A. actinomycetemcomitans</i>	56
4.9	Liberação de H ₂ O ₂ pelos BMMCs e MPs após desafio intracelular com <i>A. actinomycetemcomitans</i>	57
4.10	Análise Estatística.....	58

5	RESULTADOS.....	59
5.1	Caracterização morfológica e imunofenotipagem de BMMCs.....	61
5.2	Apoptose de BMMCs frente ao desafio com <i>A. actinomycetemcomitans</i>	62
5.2.1	Apoptose inicial.....	63
5.2.2	Apoptose tardia.....	63
5.3	Apoptose de MPs frente ao desafio com <i>A. actinomycetemcomitans</i>	65
5.3.1	Apoptose inicial.....	65
5.3.2	Apoptose tardia.....	65
5.4	Análise da atividade microbica intracelular de BMMCs: Mastócitos apresentam atividade microbica contra <i>A. actinomycetemcomitans</i> e <i>E. coli</i> , a partir de 10 horas.....	67
5.5	Análise da atividade microbica intracelular de MPs: Macrófagos possuem atividade microbica intracelular ineficaz contra <i>A. actinomycetemcomitans</i> e <i>E. coli</i>	69
5.6	Análise comparativa da atividade microbica intracelular de BMMCs x MPs contra <i>A. actinomycetemcomitans</i> : BMMCs apresentaram melhor atividade microbica contra <i>A. actinomycetemcomitans</i> que os MPs.....	70
5.7	Análise comparativa do percentual de colônias viáveis de <i>A. actinomycetemcomitans</i> , na presença ou ausência de BMMCs: Mastócitos apresentam excelente atividade microbica intracelular, principalmente quando comparado ao crescimento de <i>A. actinomycetemcomitans</i> livre de sua ação.....	72
5.8	Análise comparativa do percentual de colônias viáveis de <i>A. actinomycetemcomitans</i> , na presença ou ausência de MPs: Macrófagos	

	apresentam atividade microbicida intracelular eficaz apenas nas primeiras horas, quando comparado ao crescimento de <i>A. actinomycetemcomitans</i> livre de sua ação.....	75
5.9	Produção Intracelular e Liberação de Óxido Nítrico por BMMCs.....	78
5.9.1	<i>A. actinomycetemcomitans</i> induz alta produção intracelular de NO em BMMCs nos tempos de fagocitose e de 10h após o desafio intracelular.....	78
5.9.2	<i>A. actinomycetemcomitans</i> prejudica a liberação de NO pelos BMMCs no período de 5h, porém os BMMCs reverterem esta situação apresentando um pico de liberação de NO em 24h de desafio intracelular.....	78
5.10	Produção Intracelular e Liberação de Óxido Nítrico por MPs.....	80
5.10.1	<i>A. actinomycetemcomitans</i> induz alta produção intracelular de NO em MPs após 3 horas de desafio intracelular.....	80
5.10.2	MPs liberam altos níveis de NO frente ao desafio com <i>A. actinomycetemcomitans</i> apenas nos períodos de fagocitose e de 5 horas, com redução significativa após 24 horas de desafio.....	80
5.11	Liberação de Peróxido de Hidrogênio por BMMCs e MPs.....	82
5.11.1	<i>A. actinomycetemcomitans</i> induz aumento na liberação de H ₂ O ₂ em BMMCs nos períodos de fagocitose e de 5 horas e interfere em sua secreção após 3 horas de desafio intracelular.....	82
5.11.2	<i>A. actinomycetemcomitans</i> induz à liberação de H ₂ O ₂ em MPs no período de fagocitose e nas primeiras 10 horas de desafio intracelular.....	82
5.12	Maiores percentuais de crescimento de <i>A. actinomycetemcomitans</i> no interior de BMMCs ocorreram nos períodos de menor produção e liberação de mediadores microbicidas.....	84

5.13	Após 10 horas de desafio, redução na produção de mediadores microbicidas em MPs ocorreu simultaneamente com o aumento de colônias de <i>A. actinomycetemcomitans</i> no seu interior.....	86
6	DISCUSSÃO.....	89
7	CONCLUSÕES.....	101
	REFERÊNCIAS.....	105
	ANEXOS.....	117

1 Introdução

1. INTRODUÇÃO

As doenças periodontais (DPs) inflamatórias induzidas por placa dentobacteriana acometem os tecidos de proteção e sustentação dos órgãos dentais, representando a principal causa da perda de dentes em adultos (GENCO, 1992; KINANE; LAPPIN, 2001; LOESCHE, 1993). As DPs são patologias ósseas iniciadas principalmente por microrganismos Gram-negativos associados à placa dentobacteriana, em especial os anaeróbios estritos e facultativos, como o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), que possui a capacidade de invadir os tecidos periodontais e estabelecer uma infecção (CHRISTERSSON et al., 1987; JI; CHOI; CHOI, 2014; RUDNEY; CHEN; SEDGEWICK, 2001; SCHENKEIN, 2006).

Além da presença dos microrganismos patogênicos, sabe-se que a evolução das DPs depende da resposta imune do hospedeiro, envolvendo inúmeros tipos celulares e seus mediadores químicos (GARLET, 2010; GIANNOBILE, 2008; KINANE; ATTSTROM; EUROPEAN WORKSHOP IN PERIODONTOLOGY GROUP, 2005; KINANE; LAPPIN, 2001; KORNMAN; VAN DYKE, 2008; OFFENBACHER; BARROS; BECK, 2008). Entre as células encontradas nos tecidos periodontais, os mastócitos (MCs) têm sido observados tanto no periodonto normal quanto inflamado, em diferentes quantidades e em vários locais (ASARO et al., 1983; BATISTA; RODINI; LARA, 2005; CARRANZA; CABRINI, 1955; GUNHAN et al., 1991; HUANG et al., 2012; JEFFCOAT et al., 1985; ROBINSON; DE MARCO, 1972; SHAPIRO; ULMANSKY; SCHEUER, 1969; WALSH et al., 1995). Evidências demonstram que os MCs participam de inúmeras funções nas DPs inflamatórias, tais como, liberação de citocinas pró-inflamatórias e imunorreguladores, que ativam outras células do sistema imune; contribuindo, desta forma, para o desenvolvimento e amplificação da resposta de defesa (HUANG et al., 2012; HUANG et al., 2014; STEINSVOLL; HELGELAND; SCHENCK, 2004). Todavia, estudos in vitro têm revelado a capacidade destas células em eliminar bactérias, através de mecanismos dependentes ou independentes da fagocitose, os quais poderiam contribuir para a erradicação da infecção (MALAVIYA et al., 1994; VON KOCKRITZ-BLICKWEDE et al., 2008; WESOLOWSKI; CALDWELL; PAUMET, 2012).

A partir de trabalhos prévios desenvolvidos em nosso laboratório (LIMA et al., 2013), foi possível verificar que MCs murinos têm a capacidade de fagocitar o periodontopatógeno *A. actinomycetemcomitans*, sugerindo desta forma a participação destas células como fagócitos profissionais na DP inflamatória induzida por placa dentobacteriana. Apesar desta evidência científica in vitro sobre a capacidade fagocítica dos MCs contra *A. actinomycetemcomitans*, ainda não foi possível afirmar se este mecanismo desempenha um papel protetor, por meio de ação bactericida, ou se contribui na destruição do tecido periodontal inflamado, atuando como reservatório do periodontopatógeno.

Uma vez que *A. actinomycetemcomitans* constitui uma das bactérias amplamente relacionadas às DPs inflamatórias, torna-se de extrema importância desvendar se os MCs possuem mecanismos que culminam na morte deste periodontopatógeno internalizado, e caracterizar os aspectos da participação dos MCs na imunopatogênese das DPs inflamatórias induzidas por placa dentobacteriana.

2 Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que as diferentes modalidades de DPs atingem praticamente a totalidade da população, sendo as periodontites consideradas enfermidades ósseas mais prevalentes em humanos e importantes causas de perda dentária. Atualmente, as DPs têm sido descritas como fatores modificadores da saúde sistêmica dos pacientes (EBERSOLE; CAPPELLI, 2000; PAGE, 1998; SUSIN et al., 2004), sendo, portanto, uma doença de relevância para a saúde pública. Dados da Pesquisa Nacional de Saúde Bucal – 2010, conhecida como Projeto SB Brasil 2010, demonstraram, em termos populacionais, que o percentual de indivíduos sem nenhum problema periodontal foi de 68% para a idade de 12 anos, 51% para a faixa de 15 a 19 anos, 17% para os adultos de 35 a 44 anos e somente 1,8% nos idosos de 65 a 74 anos (BRASIL, 2010). Embora esses resultados indiquem que os problemas gengivais da população brasileira aumentam, de modo geral, com a idade, é importante realçar que os indivíduos idosos estão mais tempo expostos aos fatores de risco da doença. Assim, apenas a idade não causa doença periodontal (NUNN, 2003).

As DPs inflamatórias diferem de outras infecções por não serem causadas por um único microrganismo, mas por um grupo de bactérias. Embora mais de 700 espécies bacterianas possam ser isoladas da cavidade bucal, apenas uma pequena fração tem potencial para causar a destruição óssea periodontal (OOSHIMA; NISHIYAMA; TAMURA, 2003; SAKAI et al., 2007; TIETZE et al., 2006). Especificamente, as espécies *Porphyromonas gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* possuem a capacidade de invadir os tecidos periodontais e estabelecer uma infecção (CHRISTERSSON et al., 1987; JI; CHOI; CHOI, 2014; RUDNEY; CHEN; SEDGEWICK, 2001; SCHENKEIN, 2006).

A. actinomycetemcomitans é um bastonete Gram-negativo, curto, não formador de esporos, imóvel e anaeróbio facultativo (HENDERSON; WARD; READY, 2010; SLOTS et al., 1982). Esta bactéria é considerada um dos principais periodontopatógenos, sendo fator etiológico de determinados casos de periodontite agressiva, e presente em um significativo número dos casos de periodontite crônica, além de infecções sistêmicas (HENDERSON et al., 2010). O nicho principal para

esta espécie é a mucosa bucal, principalmente, região de sulco e bolsa gengival. Sabe-se que *A. actinomycetemcomitans* possui uma adesina proteica específica, Aae, que adere ao receptor de carboidrato nas células epiteliais humanas. Assim, *A. actinomycetemcomitans* move-se das células epiteliais bucais para a placa supragengival, possivelmente aderindo-se ao dente pela sua capacidade de produzir fímbrias (FINE et al., 2006). De forma alternativa, *A. actinomycetemcomitans* pode aderir-se a outras espécies bacterianas por co-agregação (KOLENBRANDER, 2000). A partir disso, estes organismos podem se mover da região supragengival para o ambiente subgengival. A partir deste ponto vantajoso, eles podem então se aderir ou evadir das camadas de células epiteliais da bolsa periodontal e possivelmente penetrar no tecido conjuntivo (RUDNEY et al., 2001). A organização dos biofilmes contribui tanto para o desenvolvimento como para a invasão dos periodontopatógenos, uma vez que atuam como barreira, retendo substâncias produzidas pelas próprias bactérias e, ao mesmo tempo, protegendo-as de fatores de defesa do hospedeiro e de agentes antimicrobianos externos (BEREZOW; DARVEAU, 2011; SBORDONE; BORTOLAIA, 2003).

A virulência de tal microrganismo está relacionada a sua marcante capacidade de invasão tecidual, e à produção de diversas proteases e de uma potente leucotoxina, especialmente por determinados clones extremamente virulentos, como JP2 (HAUBEK et al., 2008; SPITZNAGEL et al., 1991). A leucotoxina, produzida por *A. actinomycetemcomitans*, é um dos principais fatores de virulência pois apresenta capacidade de ativar a liberação de enzimas lisossomais e citocinas pró-inflamatórias. Além disso, esta leucotoxina induz apoptose de neutrófilos, de algumas linhagens de células T e B, de macrófagos humanos e de células endoteliais, culminando em uma ação citotóxica, a qual prejudica a resposta imune na DP (DIETMANN et al., 2013; FIVES-TAYLOR et al., 1999; HAUBEK, 2010; JOHANSSON, 2011; KACHLANY, 2010; RABIN; FLITTON; DEMUTH, 2009). Não foi possível encontrar relatos desta ação citotóxica envolvendo apoptose, em MCs.

A leucotoxina liberada por *A. actinomycetemcomitans* pode ainda retardar a produção de anticorpos, inclusive contra a própria leucotoxina, comprometendo, desta forma, a resposta do hospedeiro contra tal patógeno, resultando em maior dificuldade na obtenção de sucesso no tratamento de pacientes infectados com *A.*

actinomycetemcomitans (SAITO et al., 1993). A atividade leucotóxica entre isolados de *A. actinomycetemcomitans* é diversa, algumas cepas são minimamente leucotóxicas enquanto outras são altamente leucotóxicas (HENDERSON et al., 2010).

Apesar de o início e a progressão das DPs dependerem da presença de microrganismos periodontopatogênicos, e dos produtos destas bactérias poderem causar diretamente dano tecidual, observações histológicas em tecidos periodontais demonstram que os sítios lesados na DP estão distantes do fronte de ataque bacteriano, o que sugere uma lesão indireta causada pelas bactérias através da resposta imunológica exacerbada (CRAIG et al., 2003). Embora a DP inflamatória resulte, primariamente, de uma resposta imune à presença de bactérias da placa dentobacteriana, a suscetibilidade inata do paciente determina o resultado final do processo da doença, ou seja, a natureza da resposta inflamatória é que determina a característica destrutiva da doença (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; GEMMELL; YAMAZAKI; SEYMOUR, 2002; GENCO, 1992; GRAVES, 2008).

Apesar da resposta do hospedeiro ser destinada a controlar e/ou limitar a infecção bacteriana associada à DP, as elevadas concentrações de citocinas inflamatórias podem resultar no aumento da produção de metaloproteinases da matriz, na ativação dos osteoclastos e na reabsorção óssea (GRAVES, 2008). De modo geral, as citocinas inflamatórias atuam tanto na iniciação quanto na manutenção da resposta imune frente aos desafios bacterianos. De fato, alterações na expressão de citocinas são refletidas na exacerbação da resposta imune, o que pode resultar na destruição tecidual (PRESHAW; FOSTER; TAYLOR, 2007).

Um dos fatores que contribuem consideravelmente para a destruição tecidual presente nas DPs inflamatórias é o óxido nítrico (*nitric oxide* - NO) (BATISTA et al., 2002; BLIX; HELGELAND, 1998; BOGDAN, 2015; BRENNAN; THOMAS; LANGDON, 2003; UGAR-CANKAL; OZMERIC, 2006). Até o presente, há muita controvérsia sobre as funções e atividades biológicas deste mediador. 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 e produzem baixas

concentrações de NO por um curto período de tempo (GARCIA; STEIN, 2006; SWINDLE; METCALFE, 2007; TRIPATHI, 2007). Entretanto, a iNOS, identificada em vários tipos celulares como macrófagos, neutrófilos e MCs, é expressa em resposta a estímulos inflamatórios, tais como IL-1, TNF- α , IFN- γ e lipopolissacarídeos (LPS), sendo produzida em altas quantidades e por longo período de tempo (BLIX; HELGELAND, 1998; GARCIA; STEIN, 2006; TRIPATHI; KASHYAP; SINGH, 2007). Quando o NO é localmente produzido em altas concentrações, pode agir como molécula citotóxica contra células infectadas por fungos, bactérias, protozoários, bem como contra células próximas à região de produção de NO, podendo resultar em extensa destruição tecidual (KENDALL; MARSHALL; BARTOLD, 2001). Este gás é um dos compostos antibacterianos mais poderosos, agindo tanto na inibição do crescimento bacteriano quanto no aumento da citotoxicidade mediada por macrófagos; além disso, atua como um mediador inflamatório, interagindo com citocinas pró-inflamatórias (BOGDAN, 2015; GARCIA; STEIN, 2006; SWINDLE; METCALFE, 2007; TRIPATHI, 2007; TRIPATHI et al., 2007). Nos tecidos periodontais doentes, a presença de estímulos inflamatórios capazes de induzir a produção de NO por células inflamatórias é bem estabelecida (BATISTA et al., 2002; LEITAO et al., 2005; RODINI et al., 2008). Entretanto, a real função deste gás na patogênese da DP, se fundamental na eliminação bacteriana ou se contribui para a destruição tecidual ou ambos, permanece pouco esclarecida (BATISTA et al., 2002; UGAR-CANKAL; OZMERIC, 2006).

Assim, no contexto da DP, vários tipos celulares, residentes e/ou recrutados, atuam no microambiente local modulando a resposta do hospedeiro em busca do controle da infecção (BATISTA et al., 2005; GARLET et al., 2003; OHLRICH; CULLINAN; SEYMOUR, 2009; SEYMOUR et al., 1993). Dentre os diversos tipos celulares, os MCs também têm sido observados tanto no periodonto normal quanto inflamado, em diferentes quantidades e em vários locais (ASARO et al., 1983; BATISTA et al., 2005; CARRANZA; CABRINI, 1955; GUNHAN et al., 1991; HUANG et al., 2012; JEFFCOAT et al., 1985; ROBINSON; DE MARCO, 1972; SHAPIRO et al., 1969; WALSH et al., 1995).

Diversos trabalhos sugerem que os MCs são importantes em todas as fases evolutivas da DP inflamatória, servindo desde barreira contra a entrada de microrganismos, especialmente pela sua localização intra e subepitelial, bem como

na imunorregulação, participando na ativação de linfócitos, na cronificação da lesão ou ainda no processo de reparo tecidual (GUNHAN et al., 1991; HUANG et al., 2012; STEINSVOLL et al., 2004; WALSH et al., 1995). Estudos revelaram uma forte correlação entre a densidade de MCs triptase-positivos e a sua desgranulação, com a gravidade da periodontite crônica humana, sugerindo, desta forma, que a desgranulação dos MCs pode contribuir para a progressão da DP. Portanto, uma possível resposta do hospedeiro que implica na destruição periodontal pode envolver a participação dos MCs e de seus produtos (JEFFCOAT et al., 1985; BATISTA et al., 2005; HUANG et al., 2012). Entretanto, a real contribuição desses fatores durante a progressão da DP inflamatória ainda não está totalmente elucidada.

Atualmente, há um crescente alerta para as interações potenciais entre MCs e outros componentes do sistema imune na patogênese da DP, através da modulação de eventos celulares e humorais e de mecanismos de defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas (SKOKOS et al., 2001; VILLA et al., 2001).

Os MCs são elementos-chave do sistema imune, sendo derivados a partir de progenitores hematopoiéticos da medula óssea. MCs maduros normalmente não são encontrados na circulação, devido aos seus precursores migrarem, ainda imaturos, da medula óssea para os tecidos, onde sofrem diferenciação *in situ* e adotam um fenótipo determinado pelo microambiente (ABBAS, 2008; METCALFE; BARAM; MEKORI, 1997; RAO; BROWN, 2008; TAYLOR; METCALFE, 2001). Os MCs são células residentes do tecido conjuntivo fibroso, encontrados principalmente nos tecidos subcutâneos e nas mucosas, próximas aos vasos sanguíneos e nervos, sendo uma das primeiras células a entrar em contato com patógenos invasores (ABRAHAM; MALAVIYA, 1997; AMIN, 2012; MALAVIYA; ABRAHAM, 1998).

Essas células apresentam diversos receptores em sua membrana, incluindo aqueles para opsoninas séricas como o Fc ϵ R, o Fc γ R e o CR3, os quais podem facilitar a sua ativação a partir de patógenos opsonizados com imunoglobulinas (Ig)E, IgG ou moléculas do sistema complemento (ABRAHAM; MALAVIYA, 1997). Além disso, MCs expressam os receptores *Toll-like* (TLRs), TLR1, 2, 3, 4, 6 e 9, uma classe de receptores, que reconhecem estruturas denominadas padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) expressas

pelos patógenos (APPLEQUIST; WALLIN; LJUNGGREN, 2002; MARSHALL, 2004; MARSHALL; JAWDAT, 2004). A interação dos MCs, através de seus receptores, com o patógeno ou seus constituintes pode ocasionar a ativação destas células, seguida da liberação de seus grânulos ricos em mediadores químicos pré-formados e/ou neoformados, tais como histamina, proteoglicanas, proteases, fatores de crescimento, mediadores lipídicos como prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTs), além das citocinas IFNs, TNF- α , e ILs (ANAND et al., 2012; KODA et al., 2000; METCALFE et al., 1997; QU et al., 1998; STEINSVOLL et al., 2004). Devido à síntese e liberação de diversos tipos de mediadores inflamatórios, os MCs podem produzir alterações fisiopatológicas em vários órgãos, conduzindo ao desenvolvimento de diferentes doenças (ANAND et al., 2012). Por outro lado, existem estudos demonstrando que os MCs, além de outras funções, possuem a capacidade de modular a resposta imune inata do hospedeiro, através da sua capacidade de fagocitar bactérias gram-negativas, processá-las e apresentar antígenos bacterianos para as células T, além de recrutar outros fagócitos por meio da liberação de mediadores pró-inflamatórios (LIMA et al., 2013; MALAVIYA; ABRAHAM, 2000;2001; MALAVIYA et al., 1999; MALAVIYA; GEORGES, 2002).

MALAVIYA et al., em 1994 demonstraram que os MCs reconhecem e se ligam avidamente a bactérias do tipo *Escherichia coli*, promovendo a fagocitose e morte através da acidificação do vacúolo fagocitário e da liberação de superóxidos por essas células (MALAVIYA et al., 1994). Estes resultados indicam que os MCs possuem a capacidade de reconhecer e destruir as bactérias e, portanto, desempenhar um papel potencialmente crucial na defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas.

Durante a fagocitose de microrganismos, as células, como os neutrófilos e macrófagos, aumentam seu consumo de oxigênio molecular, resultando em um *burst* respiratório com produção de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS) e espécies reativas do nitrogênio (*reactive nitrogen species* – RNS). A formação dessas moléculas é um potente mecanismo, capaz de danificar lipídeos, proteínas e DNA (FREITAS; LIMA; FERNANDES, 2009; GILCHRIST; MCCAULEY; BEFUS, 2004). Os MCs são células capazes de se ativar e de produzir ROS após estimulação imunológica ou não (MARSHALL; JAWDAT, 2004; SUZUKI et al., 2003; SWINDLE; HUNT; COLEMAN, 2002; YOSHIMARU et al., 2006). A produção e a

liberação de óxido nítrico por essas células ainda são controversas. Muitos autores afirmam a existência deste mecanismo microbicida nos MCs, porém outros negam a ocorrência da produção de NO por estas células frente a alguns estímulos (GILCHRIST et al., 2004; SWINDLE; METCALFE, 2007; SWINDLE; METCALFE; COLEMAN, 2004).

Considerando que a atividade bactericida dos MCs envolve espécies reativas do oxigênio e a acidificação do vacúolo fagocitário, estas células compartilham com neutrófilos e macrófagos as ações fagocitária e microbicida, inserindo-se fortemente nos mecanismos de defesa do hospedeiro. Sabe-se, ainda que os MCs podem eliminar bactérias através de mecanismos independentes da fagocitose, aprisionando-as em estruturas extracelulares compostas de DNA, histonas, triptase e do peptídeo antimicrobiano LL-37, conhecidas como MCETs (*Mast cells extracellular traps*) (VON KOCKRITZ-BLICKWEDE et al., 2008). Recentemente, Wesolowski et al. (2012) demonstraram a participação de SNAP-29, um membro da família de proteínas SNARE localizada na membrana das células e em endossomos, na morte bacteriana em MCs. O grupo constatou uma correlação positiva entre a expressão de SNAP-29 e a internalização/morte de *E. coli* (WESOLOWSKI et al., 2012).

Muitos autores indicaram que bactérias vivas ou mortas, bem como seus antígenos, ativam a desgranulação de MCs com a liberação simultânea de mediadores pré-formados e citocinas contidas nos grânulos. Estudos em animais demonstraram que os MCs peritoneais desgranulam e liberam histamina em resposta à estimulação por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* in vitro (WIERZBICKI; BRZEZINSKA-BLASZCZYK, 2009). Ainda, estudos conduzidos por Malaviya et al. (1996) demonstraram o importante papel do TNF- α derivado de MCs na defesa do hospedeiro contra infecções por bactérias Gram-negativas através do recrutamento de neutrófilos para os sítios de infecção (MALAVIYA et al., 1996). O mesmo grupo, ainda, comprovou que os MCs liberam quantidades expressivas de leucotrienos, porém pouco ainda se sabe sobre os mecanismos induzidos por esse mediador em MCs frente ao estímulo por periodontopatógenos. Sabe-se que componentes presentes na parede celular bacteriana promovem diversos efeitos em MCs, como a desgranulação, a geração e a migração leucocitária (MALAVIYA; ABRAHAM, 2000; MALAVIYA; GEORGES, 2002).

A partir de trabalhos prévios desenvolvidos em nosso laboratório, foi possível verificar que MCs murinos têm a capacidade de fagocitar o periodontopatógeno *A. actinomycetemcomitans*, em níveis comparados aos macrófagos, sugerindo, desta forma, a participação destas células como fagócitos profissionais na patogênese da DP inflamatória induzida por placa dentobacteriana (LIMA et al., 2013). Apesar desta evidência científica *in vitro* sobre a capacidade fagocítica dos MCs contra *A. actinomycetemcomitans*, ainda não foi possível afirmar se este mecanismo desempenha um papel protetor ou se contribui para a destruição do tecido periodontal inflamado.

FÉGER et al. (2002) propuseram que os MCs poderiam ser um refúgio intracelular para bactérias fagocitadas (FÉGER et al., 2002). Este refúgio resultaria em uma inflamação persistente e destruição dos tecidos envolvidos. Considerando as recentes evidências da fagocitose de *A. actinomycetemcomitans* pelos MCs (LIMA et al., 2013), não podemos descartar a possibilidade de que estas células promovam um ambiente de refúgio intracelular de periodontopatógenos permitindo a persistência do processo inflamatório destrutivo, através da liberação contínua de mediadores pelos MCs após fagocitose de periodontopatógenos. Sendo assim, estudos que revelem o potencial microbicida de *A. actinomycetemcomitans* pelo MCs tornam-se de extrema importância, visto que essas células encontram-se abundantemente nos tecidos periodontais inflamados cronicamente.

No presente trabalho, propusemo-nos a investigar a capacidade microbicida intracelular *in vitro* de MCs murinos contra *A. actinomycetemcomitans*, a fim de caracterizar aspectos da participação dos MCs na resposta imune e na eliminação deste periodontopatógeno nas DPs inflamatórias. A ação microbicida destas células foi comparada àquela dos macrófagos peritoneais murinos, considerados fagócitos profissionais.

3 Proposição

3. PROPOSIÇÃO

A partir de mastócitos murinos oriundos da medula óssea de camundongos C57BL/6 desafiados in vitro com o periodontopatógeno *A. actinomycetemcomitans*, este trabalho objetivou:

- Investigar a capacidade microbicida intracelular, por meio da contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs);
- Avaliar a produção e a liberação tempo-dependente de óxido nítrico (NO) e de peróxido de hidrogênio (H₂O₂);
- Estabelecer uma relação entre a produção destes mediadores com o percentual de colônias viáveis de *A. actinomycetemcomitans*, e
- Comparar a capacidade microbicida intracelular dos mastócitos com a desenvolvida por macrófagos peritoneais murinos, considerados fagócitos profissionais.

4 Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. *Animais de Experimentação*

Camundongos (*Mus musculus*) C57BL/6 selvagens, machos e fêmeas com 4 a 6 semanas de vida, foram tratados e alojados no biotério central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (FOB-USP). Tais animais foram mantidos em microisoladores sob temperatura e iluminação controladas. A água e a alimentação foram disponibilizadas *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as especificações do Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB-USP. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo referido Comitê (CEEPA-Proc. nº 02/2013) (Anexo 1).

4.2. *Isolamento e expansão de células medulares*

Para a obtenção dos mastócitos derivados da medula óssea (*bone marrow-derived mast cells* - BMMCs), os camundongos foram eutanasiados por meio de deslocamento cervical, imergidos em um Becker contendo álcool a 77% e posicionados ventralmente. Com auxílio de pinça e tesoura curva, ambas estéreis, realizou-se a tricotomia próxima à articulação da epífise femoral com o acetábulo para a dissecação da região de interesse. Após o isolamento dos membros inferiores em relação ao restante do corpo, realizou-se uma incisão na articulação fêmoro-tibial, para isolar o fêmur. Com o auxílio de bisturi estéril, os fêmures foram desprovidos de quaisquer restos de musculatura e tecido conjuntivo, e colocados em microtubos estéreis contendo RPMI 1640 simples (RPMI com 4.5 g/L de D- glucose, 2.0 g/L de bicarbonato de sódio, 1 mM de piruvato de sódio, 25 mM HEPES e 300 mg/L L-glutamina). Todos os reagentes foram obtidos da GIBCO®, by Life Technologies™, ref. 23400-021 (Grand Island, NY, USA). Em cabine de fluxo laminar, as epífises femorais foram cortadas e o canal medular exposto. Cada medula óssea femoral foi removida por meio de lavagens do canal medular, com auxílio de uma seringa que continha 5 mL de meio RPMI 1640 completo, [RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 50 µM de β-mercaptoetanol (Sigma, St

Louis, MO, USA) e $3,024 \times 10^{-3}$ g de bicarbonato de sódio/mL (Merck®, Rio de Janeiro, BR)]. A suspensão celular foi coletada em tubo de 50 mL.

4.3. Diferenciação e Caracterização de Mastócitos Murinos

Após a obtenção da suspensão celular, oriunda do lavado da cavidade medular femoral, foi realizada a dissociação da medula por sucessivas aspirações com micropipeta de 1000 μ L e ponteira estéril. Em seguida, a suspensão foi centrifugada uma vez em RPMI completo, a 370 xg por 10 minutos. Sequencialmente, realizou-se uma lavagem do sedimento em cloreto de amônio 0,83% no intuito de promover a lise das hemácias contidas no precipitado celular e, ao final, as células medulares foram ressuspensas em 1 mL de RPMI completo.

As células foram contadas e avaliadas quanto a sua viabilidade através de Azul de Trypan a 0,4% em câmara de Neubauer. Em seguida, $1,5 \times 10^6$ células medulares por mL de RPMI completo foram plaqueadas em garrafas de 75 cm² (TPP® - Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland). Para a diferenciação e expansão celulares, foram adicionados, nas garrafas, 100 ng/mL de Fator de células tronco recombinante murino (mSCF – Stem Cell Factor) e 20 ng/mL de Interleucina-3 recombinante murino (mIL-3) (PeproTech®, Rocky Hill, NJ), a cada 4 dias, por 3 semanas. As garrafas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Após 21 dias de cultura primária, os BMMCs murinos recém-diferenciados foram submetidos à caracterização morfológica através da coloração com azul de toluidina revelando sua diferenciação para MCs, por meio da coloração positiva dos seus grânulos citoplasmáticos.

Para uma análise mais fidedigna, utilizaram-se anticorpos monoclonais contra moléculas específicas de superfície de MCs para obter a porcentagem de mastócitos diferenciados a partir de células da medula óssea de camundongo. Após diferenciação, a suspensão celular de BMMCs foi centrifugada a 370 xg a 24°C por 5 minutos e ressuspensa em 2 mL de PBS adicionado de 0,1 M de glicina (Bio-Rad®, Hercules, CA) por 10 minutos e, em seguida, centrifugada novamente a 370 xg a 24°C por 5 minutos. Na sequência, o precipitado celular foi ressuspenso em 2 mL de PBS contendo 2% de BSA (*Bovine Serum Albumin* - INLAB®, São Paulo, BR) por 45

minutos, sob leve agitação para minimizar as ligações inespecíficas. Em seguida, as células foram acondicionadas em diferentes tubos de poliestireno (5×10^5 células por tubo) para incubação dos anticorpos monoclonais (mAb) contra moléculas específicas de superfície de BMMCs. Os anticorpos são: *Anti-Mouse* CD117 (receptor c-kit) conjugado ao Cy-Chrome (PE-Cy5), *Anti-Mouse Fc epsilon Receptor I alpha* (FceR1) (receptor de alta afinidade para imunoglobulina E) conjugado a ficoeritrina (PE) e anti-AA4 (gangliosídeos derivados do GD1b, presentes apenas na membrana de MCs) conjugado a fluoresceína isoticianato (FITC). Anticorpos controles (de mesmo isotipo), conjugados aos mesmos fluorocromos, foram utilizados para que fossem descontadas as fluorescências emitidas inespecificamente. Após o tempo de incubação de 30 minutos, a 4°C sob proteção da luz, as células foram lavadas com 2 mL de PBS contendo 2% de SFB, centrifugadas a 370 xg, a 4°C, por 10 minutos e ressuspensas em 300 µL de PBS contendo 2% de paraformaldeído (PFA) para fixação das células. As preparações celulares (10.000 células por tubo) foram adquiridas em citômetro de fluxo (BD FACSCalibur™) e analisadas através do programa *Cell Quest*, de acordo com parâmetros de tamanho (FSC), granularidade (SSC) e intensidade de fluorescência dos anticorpos marcados com os fluorocromos mencionados.

4.4. Obtenção e cultura de macrófagos peritoneais de camundongos

Os macrófagos peritoneais murinos (MPs) são células classicamente consideradas fagócitos profissionais (MURRAY; WYNN, 2011), inclusive em relação as bactérias *E. coli* (CHEN et al., 2010; PEISER et al., 2000; SEWNATH et al., 2001) e *A. actinomycetemcomitans* (GELANI et al., 2009; LIMA et al., 2013). Assim, a partir da ação microbicida macrofágica, foi possível averiguar se as bactérias eram passíveis ou não de ser mortas, nas condições utilizadas no nosso laboratório; obtendo-se então um experimento padrão adicional. Além disso, foi possível comparar a capacidade microbicida apresentada por ambos os tipos celulares, MCs e macrófagos.

Para aquisição de macrófagos residentes da cavidade peritoneal, os animais foram submetidos a uma dose excessiva de anestésico composta de 100 µL

do relaxante muscular injetável Anasedan de uso veterinário (Vetbrands®) adicionado a 100 µL do anestésico geral injetável a base de Ketamina Dopalen de uso veterinário (Vetbrands®). Após a morte, o abdome foi umedecido e a pele removida de modo que a musculatura abdominal ficasse à mostra; essa foi pinçada, erguida, e foram inoculados e retirados 6 mL de RPMI simples (RPMI 1640), a fim de se recuperar as células peritoneais (MURCIANO et al., 2008).

Retirada a suspensão de células com RPMI simples da cavidade peritoneal, essas foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi ressuspense em 1 mL de RPMI completo (meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e 1% de solução estoque de penicilina-estreptomicina). Baseado no critério morfológico de viabilidade celular, as células foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando-se o método colorimétrico de exclusão com Azul de Trypan, obtendo-se um mínimo de 95% de células vivas. Novamente, as células foram contadas utilizando-se Vermelho Neutro a 0,02% para ajustar a concentração desejada de MPs (1×10^5 células/poço). Em seguida, foram pipetados 200 µL dessa suspensão de células em placas de culturas de 96 poços, sendo uma placa destinada para cada tempo de desafio intracelular (FAG, 3, 5 10 e 24h).

As placas foram incubadas a 37°C em estufa de 5% de CO₂. Após duas horas de incubação, o meio e as células não aderentes foram desprezados e os poços foram lavados duas vezes com RPMI 1640 simples. Em seguida, foram acrescentados 200 µL de RPMI 1640 completo aos MPs aderentes e novamente foram incubados a 37°C em estufa de 5% de CO₂.

Após o período *overnight* o meio RPMI 1640 completo foi removido através de duas lavagens com RPMI 1640 simples, ao final foi adicionado meio RPMI 1640 suplementado de 10% de SFB e ausente de antibiótico. Após isso, os MPs estavam aptos para o desafio bacteriano, através do ensaio UFC (item 3.5).

4.5. Cultura de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Escherichia coli*

Estudos prévios conduzidos por MALAVIYA et al. (1994), WESOLOWSKI, CALDWELL, PAUMET (2012) e LIMA et al. (2013) demonstraram que diferentes cepas de bactérias, entre elas *Escherichia coli* (*E. coli*), ligavam-se avidamente em MCs de camundongos. Esta interação bactéria/mastócito desencadeou a fagocitose (LIMA et al., 2013; MALAVIYA et al., 1994; WESOLOWSKI et al., 2012) e morte bacteriana (MALAVIYA et al., 1994; WESOLOWSKI et al., 2012) por este tipo celular. Sendo assim, para se assegurar inicialmente que as células BMMCs, obtidas em nosso laboratório, eram capazes de promover a morte bacteriana, o ensaio microbida foi realizado em oposição a *E. coli* concomitantemente a *A. actinomycetemcomitans*, obtendo-se um parâmetro de fagocitose e morte por parte dos MCs (controle).

As cepas de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523 e de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) 0:124 foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos, do Laboratório de Anaeróbios, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP - São Paulo, e manipuladas nas dependências do Centro Integrado de Pesquisas (CIP), da FOB – USP. Um volume de 100 uL da solução estoque (previamente preservada a -80°C) de *A. actinomycetemcomitans* foi transferido para um tubo cônico contendo 10 mL de meio BHI (*Brain Heart Infusion Agar*, Acumedia, Neogen Corporation, Michigan, EUA), o qual foi mantido em ambiente de microaerofilia com aproximadamente 5 - 10% de CO₂, em estufa a 37°C por 3 a 4 dias. De forma semelhante, as cepas *E. coli* foram cultivadas, entretanto foram mantidas em estufa a 37°C por 18 horas em atmosfera normal sob leve agitação. A morfologia de ambas as bactérias foi confirmada por Método de Gram e por visualização em estereoscópio (Wild Heerbrugg, Switzerland, MS 23358). A concentração de bactérias utilizada nos experimentos foi determinada com o auxílio da escala de MacFarland e ajustadas em espectrofotômetro (DU 730, Beckman Coulter, Germany) com comprimento de onda de 660λ. Para a cepa de *A. actinomycetemcomitans*, a suspensão bacteriana foi padronizada na concentração de 1x10⁹ UFC/mL e para a cepa de *E. coli* na concentração de 1x10⁷ UFC/mL.

4.6. Apoptose de BMMCs e MPs frente ao desafio de *A. actinomycetemcomitans*

A capacidade de *A. actinomycetemcomitans* internalizados em induzir mecanismos de apoptose, sob os BMMCs e MPs, foi avaliada pela utilização do kit apoptótico Anexina V-FITC (Becton, Dickinson and Company, San Jose, EUA).

Após diferenciação, os BMMCs foram transferidos e mantidos em microtubos contendo meio RPMI 1640 suplementando por 10% de soro fetal bovino, sem antibiótico, na concentração de 1×10^5 BMMCs por microtubo, por 28 horas. Estas células foram desafiadas ou não (Controle - **CTRL**) com *A. actinomycetemcomitans* (1 mastócito: 10 *A. actinomycetemcomitans*) nas últimas 3, 6, 8, 13 ou 27 horas. Mais especificamente, os seguintes passos ocorreram, cronologicamente, nestas últimas horas de desafio: - 1 hora para internalização do periodontopatógeno (LIMA et al., 2013), reconhecido como tempo de fagocitose (**FAG**); - 1 hora de sucessivas lavagens por centrifugação a 370 xg para eliminar as bactérias não internalizadas; - 1 hora de incubação em 200 µg/mL de gentamicina (Pharmanostra[®]) (antibiótico de amplo espectro que não possui capacidade de permear a membrana plasmática das células), para promover a morte das bactérias extracelulares remanescentes e assim investigar apenas a ação das bactérias ingeridas pelos BMMCs (KETAVARAPU et al., 2008; WESOLOWSKI et al., 2012); em seguida, foi realizada uma lavagem para remover a gentamicina e, novamente, foi adicionado meio RPMI 1640 suplementando por 10% de soro fetal bovino, sem antibiótico.

Sendo assim, as células, com bactérias apenas internalizadas, foram mantidas em estufa com atmosfera umidificada a 37°C e 5% de CO₂ por **3, 5, 10 ou 24h**. Estes foram os tempos de desafio intracelular considerados em nossos resultados. Finalizados estes períodos, os BMMCs foram lavados duas vezes com PBS e incubados em 100 µL de tampão de ligação carbonato/bicarbonato, em tubos de poliestireno, de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, foram adicionados 2 µL de Anexina V conjugada a FITC e 2 µL de iodeto de propídio por 15 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após incubação, acrescentaram-se 100 µL de tampão de ligação em cada tubo e as células foram analisadas em citômetro de fluxo (BD FACSCaliburTM), utilizando-se o programa

CellQuest. Concomitantemente, BMMCs desafiados ou não com as bactérias foram marcados, por 15 minutos, ora por Anexina V conjugada a FITC ora por iodeto de propídio para realizar a correta compensação de fluorescência entre os canais FL1 (FITC) e FL2 (PE). Ainda, BMMCs adicionados de 200 µg/mL de gentamicina, como explicado anteriormente, foram incubados com Anexina V conjugada a FITC e iodeto de propídio por 15 minutos, para descartar uma possível toxicidade da gentamicina sobre os MCs ou interferência do antibiótico sobre a efetividade da marcação dos sinalizadores apoptóticos.

De forma semelhante, este ensaio foi conduzido com MPs, porém em placas de 24 poços. Durante o ensaio de apoptose os MPs foram submetidos a tratamento enzimático com solução de tripsina a 0,25% a 37°C até que a maioria dos MPs estivessem destacados quando observados microscopicamente. A tripsina foi neutralizada com meio de cultura contendo 10% de SFB (GIBCO® Invitrogen).

Em resumo, este ensaio permitiu que os BMMCs e MPs fossem avaliados em dois diferentes estágios de apoptose: inicial (BMMCs Anexina V⁺) e tardio/completo (BMMCs Anexina V⁺ e Iodeto de Propídio⁺), após um período total de 27 horas, sendo que nas últimas 3, 5, 10 ou 24 horas sob desafio com o periodontopatógeno *A. actinomycetemcomitans* internalizados. Este ensaio correspondeu a um experimento realizado em triplicatas.

4.7. Atividade microbicide intracelular de BMMCs através da determinação das unidades formadoras de colônia (UFC)

Após três semanas para obtenção das células diferenciadas, a suspensão celular foi coletada e centrifugada duas vezes com meio RPMI contendo 10% de SFB ausente de antibiótico, a 370 xg por 10 minutos a 24°C; ao final, o precipitado celular foi ressuspenso em 1mL de RPMI contendo SFB. Após coloração com Azul de Toluidina, as células foram avaliadas quanto aos seus aspectos morfológicos e aqueles relacionados à diferenciação para MCs. Em seguida, as células foram contadas através da câmara de Neubauer, sendo a suspensão celular ajustada à concentração de $1,25 \times 10^6$ BMMCs/mL (RPMI contendo SFB). Os BMMCs foram também corados por meio de Azul de Trypan, para análise da viabilidade.

Para a análise da atividade microbici da intracelular in vitro, os BMMCs foram acomodados em placas de 96 poços, o que resultou em uma concentração de $2,5 \times 10^5$ BMMCs por poço. Estas células foram então desafiadas ora com *A. actinomycetemcomitans* ora com *E. coli*. Tais desafios ocorreram sob a proporção de 1 mastócito para 10 *A. actinomycetemcomitans* ou *E. coli* (1:10) por 1 hora para a internalização bacteriana (LIMA et al., 2013), reconhecido portanto como o tempo de fagocitose (**FAG**). Em alguns poços, as bactérias foram acomodadas nas mesmas concentrações estabelecidas para o desafio, porém na ausência de BMMCs, para que obtivéssemos um padrão de crescimento bacteriano livre da ação das células.

Após período de 1 hora, as células foram centrifugadas a 370 xg, por 5 minutos, a 24°C, utilizando-se um rotor basculante de placas (5804-R modelo HX 0128-00244, Eppendorf), o qual promove a aderência dos BMMCs no fundo dos poços. Foram realizadas sucessivas centrifugações, aproximadamente por 3 a 5 vezes, com troca de PBS (solução salina tamponada em fosfato – *Phosphate Buffered Solution*), objetivando eliminar as bactérias não internalizadas.

Sequencialmente, em alguns poços, as células foram incubadas por 1 hora com meio RPMI contendo SFB 10% e 200 µg/mL de gentamicina, uma vez que este antibiótico de amplo espectro não possui a capacidade de permear a membrana citoplasmática das células, promovendo a morte das bactérias extracelulares remanescentes e não das bactérias ingeridas pelos BMMCs. A efetividade do antibiótico era obtida por meio da incubação de gentamicina em poços contendo apenas bactérias. Para assegurar a eficácia da gentamicina também sobre as bactérias que possivelmente aderiram a receptores da superfície dos BMMCs, o processo de fagocitose foi impedido, em alguns poços, por meio da fixação celular com 2% de PFA por 30 minutos, previamente ao desafio bacteriano. Neste caso, a ausência de crescimento bacteriano comprovaria tal eficácia.

Em seguida, as placas foram centrifugadas (rotor a 370 xg, por 5 minutos, a 24°C) com troca de PBS, para remover a gentamicina e, novamente, foi adicionado meio RPMI 1640 suplementando com 10% de SFB, sem antibiótico em todos os poços (WESOLOWSKI et al., 2012).

Após um período de aproximadamente 3 horas que compreendeu 1 h de **FAG**, 1h de lavagens e mais 1h de gentamicina, as placas de cultura (contendo bactérias na presença ou na ausência de BMMCs, com ou sem tratamento por meio da gentamicina) foram mantidas em estufa com atmosfera umidificada a 37°C e 5% de CO₂ por mais **3, 5, 10** ou **24h**. Estes foram considerados os tempos de desafio intracelular. Finalizados estes períodos, as suspensões celulares foram centrifugadas a 370 xg (rotor) por 5 minutos a 24°C. Logo após, as células foram lisadas com 0.2 mL de PBS suplementado com saponina 5%. Após a lise dos BMMCs, as bactérias intracelulares eram diluídas em PBS e plaqueadas em placas de cultura (Petri). Para *A. actinomycetemcomitans*, foi utilizado o meio TSA (Tryptic Soy Agar, BactoTM, Becton Dickson Company, Sparks, EUA) acrescido de 0,6% de extrato de levedura (Yeast Extract, Acumedia, Neogen Corporation, Michigan, EUA), em ambiente de microaerofilia com aproximadamente 5 - 10% de CO₂, em estufa a 37°C por 1 a 2 dias. Para *E. coli*, utilizou-se o meio BHI-ágar, em estufa a 37°C por 24 horas.

O número de unidades formadoras de colônias (UFCs) bacterianas foi determinado e, posteriormente, cada valor foi multiplicado pelo fator de diluição selecionado e, depois, o valor obtido foi multiplicado pelo valor da razão entre o volume total da suspensão bacteriana diluída (200 µL) e o volume distribuído na placa de Petri (25 µl), ou seja, 8. Em seguida, foi calculado o percentual de colônias viáveis (na presença ou na ausência de BMMCs), após os tempos considerados de desafio, ou seja, **3, 5, 10** e **24h**, através da equação:

$$\frac{\text{UFC (após 3, 5, 10 ou 24h)}}{\text{UFC após FAG}} \times 100$$

UFC após **FAG**

Uma vez que o tempo FAG representa o tempo necessário para a internalização bacteriana, o mesmo foi utilizado como parâmetro de comparação, recebendo o valor 100%. Foram obtidas médias $\pm$ desvio padrão de percentual de colônias viáveis, a partir de triplicatas de um experimento representativo, selecionado dentre 4 experimentos independentes com padrão microbicida semelhante.

Semelhantemente aos ensaios microbicidas com BMMCs, foram realizados os mesmos ensaios utilizando-se MPs. Entretanto, não houve a necessidade da centrifugação das células, com rotor, visto que os MPs possuem a capacidade de aderir aos poços. Portanto, as lavagens, após período FAG e após incubação com gentamicina, foram realizadas diretamente na placa.

4.8. Produção intracelular e liberação de Óxido Nítrico pelos BMMCs e MPs após desafio com *A. actinomycetemcomitans*.

Ambos os tipos celulares foram desafiados com *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 29523), como descrito no item 3.5, ou com 100 ng/mL de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich), após a remoção de gentamicina. Como controle negativo, as células foram incubadas apenas com meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB ausente de antibiótico. Finalizados os períodos de desafio intracelular (3, 5, 10 e 24 horas) as placas de 96 poços foram centrifugadas a 370 xg por 5 minutos a 24°C e o sobrenadante armazenado a -80°C para as futuras dosagens de Óxido Nítrico (NO) extracelular pelo método de Griess.

Para a dosagem intracelular de NO, as células presentes no fundo dos poços foram ressuspensas em PBS. As placas contendo BMMCs foram centrifugadas novamente como no passo anterior. Foram adicionados em cada poço, que continha células desafiadas ou não, 196 µL de PBS estéril e 4 µL do reagente DAF-FM diacetato a 10 µM (Molecular Probes®; n° do catálogo: D-23842), um corante fluorescente sensível a NO e permeável à célula. As placas foram mantidas em estufa com atmosfera umidificada a 37°C e 5% de CO₂, sob proteção da luz, por 30 minutos. Posteriormente, os poços foram lavados duas vezes com 200 µL de PBS e, ao final, o mesmo volume de PBS foi adicionado. Na sequência, realizou-se a leitura de fluorescência por toda a área do fundo do poço das placas de cultura, em espectrofotômetro automático de microplacas (Synergy™ Mx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate Reader - Biotek® Instruments), na excitação de 495 nm e emissão de 515 nm com sensibilidade do leitor ajustada em

100. Os dados foram expressos em unidades relativas de fluorescência (RFU – *Relative Fluorescence Unit*).

Para avaliação da liberação de NO extracelular, os sobrenadantes armazenados foram descongelados e submetidos ao método de Griess. Para isso, pipetaram-se 100 µL das amostras, da curva padrão de nitrito de sódio (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 e 1.5 µM) e de água deionizada (branco) em placas de 96 poços. Em seguida, 100 µL do reagente de Griess, preparado a partir de mistura igual de NEED 1% [N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride] (Sigma Aldrich®) e sulfanilamida 1% (Sigma Aldrich®), foram adicionados nos poços e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente e sob proteção da luz. Após este período, a leitura foi realizada em absorbância (540nm) no espectrofotômetro.

4.9. Liberação de H₂O₂ pelos BMMCs e MPs após desafio intracelular com *A. actinomycetemcomitans*.

Para dosar H₂O₂ extracelular, utilizou-se o kit Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay (Molecular probes®; n° do catálogo: A22 188) e o desafio citado no item 3.5 foi realizado em meio HBSS sem vermelho de fenol suplementado com 10% de soro fetal bovino. Ao final dos tempos de estímulo, as placas foram centrifugadas a 370 xg, por 5 minutos a 24°C e os sobrenadantes coletados e armazenados a - 80°C para avaliações futuras. Em placa de 96 poços (96 well assay black plate, clear bottom– Corning Incorporated), pipetaram-se todas as amostras armazenadas anteriormente, no volume de 50 µL, bem como 50 µL/poço do tampão 1x (branco) e das diluições seriadas de 1 a 20 µM de H₂O₂ (curva padrão).

Em seguida, 50 µL da solução de trabalho (10 mM de amplex, 100 µL de *Horseradish peroxidase* e 4,85 mL de solução tampão 1x) foram adicionados e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz. Posteriormente, realizou-se a leitura de absorbância em 560 nm. Os resultados expressos em picomoles foram determinados pela comparação com uma curva padrão, como indicado pelo fabricante.

4.10. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (SD) dos valores obtidos para cada grupo. A análise estatística foi realizada por meio do teste estatístico ANOVA Fatorial seguido do teste de Tukey. Os dados foram transformados em logaritmo para aplicação do teste estatístico, pois os originais não passavam pelos critérios de normalidade. Valores de $p < 0.05$ foram considerados como indicativos de significância estatística. Para avaliar as correlações entre variáveis, empregou-se o teste de correlação de Pearson (HINKLE; WIERSMA; JURS, 2003).

5 Resultados

5. RESULTADOS

5.1. *Caracterização morfológica e imunofenotipagem de BMMCs*

Após 21 dias de cultura primária, BMMCs foram submetidos à caracterização morfológica e imunofenotípica, através da coloração com azul de toluidina e imunomarcação das moléculas de superfície de MCs, respectivamente. As fotomicrografias apresentadas nas Figuras 1A e 1B, através de microscopia óptica convencional e após coloração com azul de toluidina, revelaram a presença de inúmeros MCs maduros (bem diferenciados) providos de citoplasma repleto de grânulos metacromáticos confirmando aspectos inerentes a este tipo celular e permitindo diferenciá-los de outros subtipos celulares presentes. Raras células estavam ausentes de grânulos corados, sugerindo tratar-se de MCs aparentemente desgranulados devido à exocitose de seus grânulos. Notaram-se ainda células de tamanhos variáveis ora pequenas com núcleos rechaçados, ora grandes com núcleos exuberantes localizados centralmente a célula.

A fim de corroborar os dados já observados pela coloração com azul de toluidina e para uma análise mais fidedigna, as células diferenciadas foram marcadas com anticorpos monoclonais contra moléculas específicas de superfície de MCs murinos e analisadas por citometria de fluxo. Das células com tamanho e granularidade compatíveis com MCs, 99% eram CD117⁺/FcεRI⁺ (Figura 1C). Esta dupla marcação confirmou a obtenção de uma cultura pura de MCs diferenciados. Observou-se ainda uma frequente expressão (98%) de AA4 (Figura 1D), confirmando mais uma vez a homogeneidade da cultura celular de MCs.

Figura 1 - Caracterização morfológica e imunofenotipagem dos mastócitos murinos. Após três semanas de diferenciação celular, os BMMC foram corados com azul de toluidina **(A e B)** apresentando citoplasma com grânulos metacromáticos. **(C)** e **(D)** Imunofenotipagem através de análise por citometria de fluxo, demonstrando que a maioria das células expressaram CD117 e FcεRI simultaneamente, e AA4; tais receptores são encontrados na superfície de mastócitos, confirmando a homogeneidade da cultura celular.

5.2. Apoptose de BMNCs frente ao desafio com *A. actinomycetemcomitans*

Após um período total de 27 horas, sendo que nas últimas 3, 5, 10 ou 24 horas sob desafio com *A. actinomycetemcomitans* internalizados, os BMNCs foram avaliados nos seus estágios inicial (BMNCs Anexina V⁺) e tardio (BMNCs Anexina V⁺ e Iodeto de Propídio⁺) de apoptose. Estes resultados foram comparados

com aqueles obtidos após a primeira hora de desafio, considerada o tempo de fagocitose (FAG), bem como com aqueles referentes às células não desafiadas (CTRL).

Na ausência do desafio bacteriano (**CTRL**), após um período de 27 horas em condições adequadas, houve um baixo percentual de BMMCs Anexina V⁺ (24,73%) e de Iodeto de Propídio (4,23%). Porém, quando as células foram submetidas ao *A. actinomycetemcomitans* nas últimas horas de um período total de 27 horas, o percentual de apoptose (inicial e tardio) foi maior que o **CTRL**, de um modo geral. Estes resultados serão detalhados a seguir.

5.2.1. Apoptose inicial

O desafio intracelular com *A. actinomycetemcomitans* por **10h** (33,99 ±3,02%) e **24h** (47,59 ±3,62%) resultou em maior percentual de BMMCs com apoptose inicial, em comparação às células **CTRL** (24,73 ±1,52%) ($p=0,004$ e $p=0,0001$, respectivamente) (Gráfico 1A).

Avaliando os BMMCs desafiados com *A. actinomycetemcomitans*, verificou-se um aumento significativo nos percentuais de BMMC Anexina⁺ em todos os tempos de desafio intracelular: **3h** (31,47 ±1,81%), **5h** (31,2 ±4,18%), **10h** (33,99 ±3,01%) e **24h** (47,59 ± 3,62%), quando comparados ao tempo de 1 hora de fagocitose (**FAG** - 23,8 ±1,76%). Além disso, constatou-se também um aumento significativo de apoptose inicial de BMMCs após **24h** (47,59 ±3,62%), em relação aos outros tempos de desafio intracelular ($p<0,0002$).

5.2.2. Apoptose tardia

Considerando a apoptose final (percentual de BMMCs Anexina⁺ e Iodeto de Propídio⁺), embora os percentuais de células positivas tenham sido baixos, observou-se que o periodontopatógeno causou apoptose completa em BMMCs, já que houve um maior percentual estatisticamente significante entre os BMMCs desafiados (**FAG**: 7,10 ±0,32%, **3h**: 8,63 ±1,01%, **5h**: 7,4 ±0,58%, **10h**: 8,89 ±0,71%

e **24h**: $9,16 \pm 0,67\%$) em relação às células não desafiadas (**CTRL** - $4,23 \pm 0,17\%$) (Gráfico 1B).

Os percentuais de BMMCs em apoptose tardia, após **3h**, **10h** e **24h** de desafio intracelular, foram estatisticamente maiores comparados ao tempo de fagocitose ($p=0,038$, $p=0,01$ e $p=0,002$ respectivamente). Além disso, o percentual de morte de BMMCs desafiados por **5h** com *A. actinomycetemcomitans* foi menor em relação a **10h** e **24h** de desafio ($p=0,04$ e $p=0,01$ respectivamente) (Gráfico 1B).

Esses resultados indicam que o periodontopatógeno *A. actinomycetemcomitans* induz mecanismos de **apoptose inicial** nos BMMCs especialmente após 10 e 24 horas de desafio e este fenômeno foi mais evidente no período de 24 horas (Gráfico 1A). Vale ressaltar, ainda, que o percentual de **apoptose tardia** dos BMMCs foi estatisticamente maior em todos os tempos de desafio quando comparado aos BMMCS **CTRL**. Entretanto, a **apoptose tardia**, em nosso modelo experimental in vitro mesmo após o desafio bacteriano, não ultrapassou 10%, indicando manutenção da viabilidade celular de 90% dos BMMCs frente ao desafio deste periodontopatógeno.

Figura 2 - Percentual de BMMCs Anexina V⁺ (A) ou Anexina V⁺ e Iodeto de Propídio⁺ (Anexina PI⁺) (B), por 28 horas (CTRL – não desafiados), após o tempo de fagocitose de 1 hora (FAG), e após o desafio intracelular com *A. actinomycetemcomitans* (A.a.) por 3, 5, 10 e 24 horas. Os dados foram obtidos após utilização do kit apoptótico Anexina V-FITC e analisados por citometria de fluxo. Os resultados foram avaliados estatisticamente por meio do teste Anova Fatorial, seguido do teste de Fisher. ^α $p < 0.05$ em relação aos BMMCs CTRL; ^β $p < 0.05$ em relação aos BMMCs FAG; ^ε $p < 0.05$ em relação aos BMMCs desafiados por 5 horas com A.a.; ^γ $p < 0.05$ em relação aos BMMCs desafiados por FAG, 3, 5 e 10 horas com A.a.

5.3. Apoptose de MPs frente ao desafio com *A. actinomycetemcomitans*

De forma semelhante aos BMMCs, os MPs demonstraram, na ausência do desafio bacteriano (**CTRL**), um baixo percentual de apoptose inicial ($33,24 \pm 2,94\%$) e tardia ($3,59 \pm 0,39\%$). Entretanto, quando as células foram desafiadas com *A. actinomycetemcomitans* nas últimas horas de um período total de 27 horas, o percentual de apoptose (inicial e tardia) foi maior em relação ao **CTRL**.

5.3.1. Apoptose inicial

O desafio intracelular com *A. actinomycetemcomitans* nos períodos de **5h** ($59,08 \pm 8,85\%$), **10h** ($52,75 \pm 5,80\%$) e **24h** ($53,84 \pm 2,91\%$) resultou em maior percentual de MPs com apoptose inicial, em comparação aos MPs CTRL ($33,24 \pm 2,94\%$) ($p=0,001$, $p=0,018$ e $p=0,011$, respectivamente) (Gráfico 2A).

Comparando-se os MPs desafiados com *A. actinomycetemcomitans*, observou-se um aumento significativo nos percentuais de MPs Annexina⁺ no período de **5h** ($59,08 \pm 8,85\%$) em relação ao tempo de fagocitose (**FAG** - $38,17 \pm 9,22\%$). Interessantemente, constataram-se, no período de **3h**, valores percentuais menores ($27,90 \pm 10,14\%$) àqueles observados em **5h**, **10h** e **24h** ($p= 0,0002$, $p= 0,0017$ e $p= 0,0011$, respectivamente) (Gráfico 2A).

5.3.2. Apoptose tardia

Em relação à apoptose final (percentual de MPs Annexina⁺ e Iodeto de Propídio⁺), foi observado, assim como nos BMMCs, baixos valores percentuais de MPs positivos. Após desafio com *A. actinomycetemcomitans*, houve um aumento significativo de apoptose tardia entre os MPs nos períodos de **FAG** ($6,38 \pm 0,58\%$), **5h** ($7,29 \pm 0,72\%$), **10h** ($9,82 \pm 0,54\%$) e **24h** ($6,12 \pm 1,31\%$), quando comparados com MPs não desafiados **CTRL** ($4,23 \pm 0,17\%$); ou seja, este periodontopatógeno induziu apoptose tardia em MPs (Gráfico 2B). Entretanto, de forma semelhante a apoptose inicial, os MPs submetidos a **3h** de desafio intracelular apresentaram os menores valores percentuais de apoptose tardia, quando comparados a todos os

períodos de desafio (**FAG, 5h, 10h e 24h** – $p < 0,001$). Além disso, no período de **10h** houve o maior valor percentual de MPs em apoptose tardia, ($9,82 \pm 0,54\%$) em relação a todos os parâmetros investigados (Gráfico 2B).

Esses resultados indicam que o periodontopatógeno *A. actinomycetemcomitans* induz mecanismos de **apoptose inicial** nos MPs especialmente após **5h, 10h e 24h** de desafio e este fenômeno foi mais evidente no período de **5h** (Gráfico 2A). Já o percentual de **apoptose final** dos MPs foi significativamente maior nos períodos de **FAG** e de **5h, 10h e 24h** de desafio intracelular, quando comparado àquele observado entre MPs **CTRL**. Os MPs submetidos a **3h** apresentaram os menores valores percentuais de apoptose, principalmente a tardia, considerando apenas células desafiadas. É importante ressaltar que a **apoptose final**, semelhantemente aos BMMCs, não excedeu a 10%. Portanto, 90% dos MPs apresentaram-se viáveis frente ao desafio deste periodontopatógeno.

Figura 3 - Percentual de MPs Anexina V⁺ (A) ou Anexina V⁺ e Iodeto de Propídio⁺ (Anexina PI⁺) (B), não desafiados por 28 horas (CTRL), após o tempo de fagocitose de 1 hora (FAG), e após o desafio intracelular com *A. actinomycetemcomitans* (A.a.) por 3, 5, 10 e 24 horas. Os dados foram obtidos após utilização do kit apoptótico Anexina V-FITC e analisados por citometria de fluxo. Os resultados foram avaliados estatisticamente por meio do teste Anova Fatorial, seguido do teste de Fisher. ^a $p < 0,05$ em relação aos MPs CTRL; ^b $p < 0,05$ em relação aos MPs FAG; ^c $p < 0,05$ em relação aos MPs desafiados por 3 horas com A.a.; ^d $p < 0,05$ em relação aos MPs desafiados por 5 horas com A.a. ^e $p < 0,05$ em relação aos MPs desafiados por 10 horas com A.a.

5.4. *Análise da atividade microbicida intracelular de BMMCs: Mastócitos apresentam atividade microbicida contra A. actinomycetemcomitans e E. coli, a partir de 10 horas*

A capacidade microbicida de BMMCs foi avaliada, através do ensaio de UFC, durante os períodos de 3, 5, 10 e 24 horas de desafio com *A. actinomycetemcomitans* ou *E. coli* internalizados.

Após **3h** e **5h** de desafio intracelular com o periodontopatógeno *A. actinomycetemcomitans*, foi observado um aumento significativo ($313 \pm 11,79\%$ e $699 \pm 57,70\%$, respectivamente) de colônias viáveis no interior dos BMMCs em relação ao período **FAG**. Houve um aumento significativo de **3h** para **5h** ($p=0,009$). Entretanto, entre os períodos de **5h** e **10h**, bem como de **10h** e **24h**, os valores percentuais decrescem significativamente ($p=0,0016$ e $p=0,00018$, respectivamente). No período de **24h**, foi observado o menor valor percentual de colônias viáveis de *A. actinomycetemcomitans* no interior de BMMCs ($22 \pm 6,02\%$) em relação a todos os períodos investigados (Figura 3A).

Comparando-se com o valor do **FAG**, os BMMCs apresentaram, após **24h**, uma redução de 78% de bactérias *A. actinomycetemcomitans* fagocitadas inicialmente. Vale ressaltar ainda que, ao se comparar os períodos de **10h** ou **24h** com o período de **5h**, no qual houve o maior pico de proliferação bacteriana intracelular, nota-se uma importante redução de bactérias viáveis no interior dos BMMCs, ou seja, 77,11% e 96,85%, respectivamente (Figura 3A).

Em relação ao desafio intracelular com *E. coli*, os BMMCs comportaram-se de forma similar a *A. actinomycetemcomitans*, em alguns períodos de desafio intracelular. Após **3h** e **5h**, também foi verificado um aumento significativo ($457 \pm 25,11\%$ e $374 \pm 20,55\%$, respectivamente) de colônias viáveis no interior dos MCs, em comparação ao período **FAG** (100%). Entretanto, o percentual de *E. coli* intracelular no período de **5h** foi ligeiramente menor àquele encontrado em **3h**. A diminuição desta carga bacteriana (*E.coli*) no interior dos MCs foi mais evidente e estatisticamente significante entre os períodos de **5h** e **10h** ($p=0,00013$) e de **10** e **24h** ($p<0,000001$). Semelhantemente ao *A. actinomycetemcomitans*, após **24h**, observou-se o menor percentual de colônias de *E. coli* no interior de BMMCs ($10 \pm$

8,89%) em relação a todos os períodos investigados (**FAG, 3h, 5h, 10h** – $p < 0,00001$) (Figura 3B).

Comparando-se com o valor do FAG, os BMMCs apresentaram, após 24 horas, uma redução de 90% de bactérias *E. coli* fagocitadas inicialmente. Vale ressaltar ainda que, ao se comparar o período de **24h** com o de **3h**, no qual houve o maior pico de proliferação bacteriana intracelular, nota-se uma importante redução de bactérias viáveis no interior dos BMMCs, ou seja, 97.81% (Figura 3B).

Esses resultados revelaram que os MCs foram capazes de eliminar de forma eficaz ambas as bactérias, em especial após o período de **24h** de desafio intracelular.

Figura 4 - Média $\pm$ desvio padrão do percentual de colônias viáveis de *A. actinomycetemcomitans* (A) ou de *E. coli* (B) no interior de BMMCs após 3, 5, 10 e 24 horas de desafio intracelular, subsequente a um período de fagocitose de 1 hora. A linha tracejada, em vermelho, representa o valor do período de fagocitose (FAG – 100%). Os dados representam triplicatas de um experimento representativo, os quais foram avaliados estatisticamente por meio do teste Anova Fatorial, seguido do teste de Fisher. $p < 0.05$ em relação ao período FAG (a); $p < 0.05$ em relação ao desafio intracelular por 3h (b), 5h (c) e 10h (d).

5.5. *Análise da atividade microbicida intracelular de MPs: Macrófagos possuem atividade microbicida intracelular ineficaz contra A actinomycetemcomitans e E. coli.*

Diferentemente dos BMMCs, constatou-se, no período de 3 horas, uma diminuição significativa do percentual de colônias viáveis de *A. actinomycetemcomitans* no interior de MPs ($50,33 \pm 12,50\%$) em relação ao período **FAG** ($p < 0,00001$), ou seja, uma capacidade microbicida de 49,77% contra o periodontopatógeno. Entretanto, nos períodos de **5h**, **10h** e **24h** houve um aumento percentual significativo desta bactéria em comparação a **FAG** (**5h** $126,67 \pm 10,60\%$ – $p = 0,0077$; **10h** $345,33 \pm 33,26\%$ – $p < 0,00001$; **24h** $1178 \pm 19,05\%$ – $p < 0,000001$). Ao se comparar os períodos de **5h**, **10h** ou **24h** com o período de **3h**, no qual houve o menor percentual de UFC, o aumento de bactérias *A. actinomycetemcomitans* viáveis no interior dos MPs foi 152%, 586% e 2240% respectivamente ($p < 0,0001$). Assim, após **3h** de desafio, notou-se um aumento tempo-dependente da carga bacteriana intracelular, nos macrófagos, visto que houve diferença estatisticamente significativa de um período de desafio intracelular para o outro subsequente (Figura 4A).

Em relação ao desafio intracelular com *E. coli*, os valores percentuais de colônias viáveis no interior de MPs, no período de **3h** ($348 \pm 27,07\%$), foram maiores que **FAG**. Porém, uma redução significativa foi constatada no período de **5h** ($59 \pm 8,54\%$), em relação a **FAG** bem como ao período de **3h** ($p < 0,0001$). Após **10h** e **24h** ($316 \pm 46,86\%$ e $1317 \pm 61,45\%$, respectivamente), o valor percentual de colônias viáveis de *E. coli* no interior de MPs foi maior quando comparado ao período **FAG** ($p < 0,0001$). Este aumento significativo também foi verificado entre os períodos de **5h** e **10h** ($p < 0,00001$) e **10h** e **24h** ($p < 0,00001$). No período de **24h**, houve o maior valor percentual de colônias viáveis de *E. coli* no interior de MPs ($1317 \pm 61,45\%$) em relação a todos os períodos investigados.

Esses resultados demonstraram a ineficácia da ação microbicida intracelular pelos MPs contra ambas as bactérias, especialmente após a décima hora de desafio.

Figura 5 - Média $\pm$ desvio padrão do percentual de colônias viáveis de *A. actinomycetemcomitans* (A) ou de *E. coli* (B) no interior de MPs após 3, 5, 10 e 24 horas de desafio intracelular, subsequente a um período de fagocitose de 1 hora. A linha tracejada, em vermelho, representa o valor do período de fagocitose (FAG – 100%). Os dados representam triplicatas de um experimento representativo, os quais foram avaliados estatisticamente por meio do teste Anova Fatorial, seguido do teste de Fisher. (a) $p < 0.05$ em relação ao período FAG; $p < 0.05$ em relação ao desafio intracelular por 3h (b), 5h (c) e 10h (d).

5.6. **Análise comparativa da atividade microbica intracelular de BMMCs x MPs contra *A. actinomycetemcomitans*: BMMCs apresentaram melhor atividade microbica contra *A. actinomycetemcomitans* que os MPs.**

Comparando-se a atividade microbica dos dois tipos celulares, em relação ao periodontopatógeno, verificou-se nos períodos de **3h** e **5h** de desafio, um menor percentual de colônias viáveis no interior de MPs ($50,33 \pm 12,50\%$ e $126,67 \pm 10,60$, respectivamente), em comparação aos BMMCs ($313 \pm 11,79\%$ e $699 \pm 57,70\%$, respectivamente) ($p < 0,00001$) (Figura 6).

Interessantemente, o inverso foi observado nos períodos de **10h** e **24h**, menores valores percentuais de colônias intracelulares de *A. actinomycetemcomitans* foram encontrados entre os BMMCs ($160 \pm 24,78\%$ e $22 \pm 6,02\%$, respectivamente) em relação aos MPs ($345,33 \pm 33,26\%$ e $1178 \pm 19,05\%$) ($p < 0,00001$) (Figura 6).

Comparando-se os valores percentuais mais elevados de UFC no interior das células, constatou-se que os MPs (24h - $1178 \pm 19,05\%$) apresentaram níveis significativamente maiores quando comparados aos BMMCs (5h - $699 \pm 57,70\%$). Por outro lado, comparando-se os menores valores percentuais de colônias viáveis intracelulares, aqueles dos BMMCs (24h - $22 \pm 6,02\%$) foram significativamente menores em relação aos MPs (3h - $50,33 \pm 12,50\%$). Dessa forma, os BMMCs parecem apresentar melhor atividade microbicida contra *A. actinomycetemcomitans* que os MPs.

Figura 6 - Comparação da capacidade microbicida intracelular contra *A. actinomycetemcomitans*, entre os dois tipos celulares. Média $\pm$ desvio padrão do percentual de colônias viáveis de *A. actinomycetemcomitans* no interior de BMMCs ou MPs após 3, 5, 10 e 24 horas de desafio in vitro, subsequente a um período de fagocitose de 1 hora. A linha tracejada, em vermelho, representa o valor do período de fagocitose (FAG – 100%). Os dados representam triplicatas de um experimento representativo, os quais foram avaliados estatisticamente por meio do teste Anova Fatorial, seguido do teste de Fisher. *** diferem estatisticamente $p < 0.05$.

5.7. Análise comparativa do percentual de colônias viáveis de *A. actinomycetemcomitans*, na presença ou ausência de BMMCs: Mastócitos apresentam excelente atividade microbicida intracelular, principalmente quando comparado ao crescimento de *A. actinomycetemcomitans* livre de sua ação.

O percentual de colônias viáveis de *A. actinomycetemcomitans* livres da ação de BMMCs (**Aa**) foi comparado ao percentual de colônias viáveis presentes no interior dos BMMCs (**Aa-MCs**). Embora as bactérias livres da ação celular (**Aa**) não tenham recebido o tratamento com gentamicina, foi possível comparar ambas as condições (**Aa** e **Aa-MCs**), pois o cálculo do percentual de colônias viáveis foi realizado a partir dos valores obtidos nos respectivos períodos **FAG**.

Ao analisarmos o potencial de crescimento de **Aa** entre os diferentes tempos subsequentes de desafio (intervalo), observou-se de **FAG** a **3h** um aumento percentual aproximado de 1054%. O crescimento também foi notado nos outros intervalos: de **3h** a **5h** - 333%, de **5h** a **10h** - 664% e de **10h** a **24h** - 20% (Figura 7A). O aumento percentual de colônias viáveis também foi notado no **Aa-MCs**, nos primeiros intervalos, ou seja, 213% de **FAG** a **3h**, e 123% de **3h** a **5h**. Apesar desses aumentos, é importante enfatizar que, ao compararmos ambas as condições, o ambiente intracelular dos MCs não permitiu o alto crescimento bacteriano observado na condição livre dos BMMCs. De forma mais detalhada, ao compararmos os valores percentuais dos intervalos (**FAG** e **3h**) obtidos nas diferentes condições, ou seja, 1054% para **Aa** e 213% para **Aa-MCs**, houve no ambiente intracelular, aproximadamente, um crescimento bacteriano de apenas 20% daquele observado na condição livre de BMMCs, ou seja, as células impediram que 80% deste crescimento ocorresse. De forma similar, de **3h** a **5h**, os BMMCs permitiram um crescimento bacteriano de apenas 37% daquele observado na sua ausência, ou seja, as células impediram este crescimento em 63% (Figura 7B).

Entre os intervalos **5h-10h** e **10h-24h**, os **Aa-MCs** apresentaram uma redução de crescimento bacteriano de 77% e 86%, respectivamente (Figura 7A). Ao compararmos ambas as condições, considerando o intervalo de **5h** para **10h**, houve no ambiente intracelular, aproximadamente, uma redução do crescimento bacteriano de 116% quando comparado àquele na condição livre de BMMCs. Por meio de

comparação similar, porém no intervalo de **10h** a **24h**, houve no ambiente intracelular, aproximadamente, uma redução do crescimento bacteriano de 530% em comparação àquele na condição livre de BMMCs. Esta foi a mais eficiente atividade microbicida intracelular contra *A. actinomycetemcomitans*, observada pelos BMMCs, em nossos ensaios in vitro (Figura 7B).

Portanto, os MCs interferiram fortemente no potencial de crescimento de *A. actinomycetemcomitans*, ou seja, essas células possuem eficiente ação microbicida em todos os tempos avaliados, especialmente após **5h** de desafio intracelular.

Figura 7 - Colônias viáveis de *A. actinomycetemcomitans* na presença ou ausência de BMMCs.

(A) Média do percentual de colônias viáveis de *A. actinomycetemcomitans* livres da ação de BMMCs (Aa) ou no interior dessas células (Aa-MCs) após 3, 5, 10 e 24 horas de desafio in vitro, subsequente a um período de fagocitose de 1 hora (FAG – 100%). As médias foram comparadas entre os diferentes tempos subsequentes de desafio (intervalo) para obter o aumento/redução do crescimento bacteriano. **(B)** Esquema ilustrativo do crescimento bacteriano, comparando ambas as condições (Aa e Aa-MCs) em cada um dos intervalos. Um experimento representativo de três experimentos independentes.

5.8. Análise comparativa do percentual de colônias viáveis de *A. actinomycetemcomitans*, na presença ou ausência de MPs: Macrófagos apresentam atividade microbicida intracelular eficaz apenas nas primeiras horas, quando comparado ao crescimento de *A. actinomycetemcomitans* livre de sua ação.

O percentual de colônias viáveis de *A. actinomycetemcomitans* livres da ação de MPs (**Aa**) também foi comparado àquele obtido a partir do desafio intracelular com MPs (**Aa-MPs**). Ao analisarmos o potencial de crescimento de **Aa** nos diferentes intervalos, verificou-se de **FAG** para **3h** um aumento percentual aproximado de 576%. O aumento também foi observado nos outros intervalos: de **3h** a **5h** - 895%, de **5h** a **10h** - 75% e de **10h** a **24h** - 280% (Figura 8A). Na condição **Aa-MPs**, houve uma redução de 50% no percentual de colônias viáveis de **FAG** a **3h**, e aumento nos outros intervalos, ou seja, de **3h** a **5h** - 152%, de **5h** a **10h** - 174% e de **10h** a **24h** - 241% (Figura 8A).

Comparando-se ambas as condições (**Aa** e **Aa-MPs**), no intervalo de **FAG** a **3h**, houve no ambiente intracelular dos MPs uma redução de 109% no crescimento de *A. actinomycetemcomitans*, quando comparado àquele observado na condição livre de MPs. De modo semelhante, no intervalo subsequente de **3h** a **5h**, os MPs reprimiram o crescimento de *A. actinomycetemcomitans* em 83%, possibilitando um crescimento bacteriano de apenas 17% daquele observado na condição livre de MPs (Figura 8B). Porém, no intervalo de **5h** para **10h**, o ambiente intracelular dos MPs possibilitou um maior crescimento do periodontopatógeno, quando comparado àquele observado na condição livre de MPs, ou seja, um aumento de 132% de crescimento bacteriano. Subsequentemente, de **10h** a **24h**, o crescimento bacteriano volta a ser menor no interior dos MPs que na condição livre; sua atividade microbicida intracelular promoveu uma redução de 14% (Figura 8B).

Sendo assim, esses dados nos levam a inferir que nas primeiras 5 horas, pós-fagocitose, o ambiente intracelular dos MPs mostrou-se eficaz, ora matando, ora contendo o alto crescimento bacteriano observado na condição livre dos MPs. Entretanto, entre os períodos de **5h** a **10h**, os MPs fracassaram em sua ação microbicida contra *A. actinomycetemcomitans*, já que o ambiente intracelular dos MPs propiciou melhores condições de crescimento ao periodontopatógeno quando

comparado àquele observado na condição livre de MPs. Após este período, suas habilidades de contenção bacteriana foram restabelecidas.

A

B

Figura 8 - Colônias viáveis de *A. actinomycetemcomitans* na presença ou ausência de MPs. (A) Média do percentual de colônias viáveis de *A. actinomycetemcomitans* livres da ação de MPs (Aa) ou no interior dessas células (Aa-MPs) após 3, 5, 10 e 24 horas de desafio in vitro, subsequente a um período de fagocitose de 1 hora (FAG – 100%). As médias foram comparadas entre os diferentes tempos subsequentes de desafio (intervalo) para obter o aumento/redução do crescimento bacteriano. **(B)** Esquema ilustrativo do crescimento bacteriano, comparando ambas as condições (Aa e Aa-MPs) em cada um dos intervalos. Um experimento representativo de três experimentos independentes.

5.9. *Produção Intracelular e Liberação de Óxido Nítrico por BMMCs:*

5.9.1. *A. actinomycetemcomitans induz alta produção intracelular de NO em BMMCs nos tempos de fagocitose e de 10h após o desafio intracelular.*

Avaliando a produção intracelular de óxido nítrico por BMMCs desafiados com *A. actinomycetemcomitans* em relação àqueles estimulados ou não com LPS, em cada tempo de desafio, observou-se nos tempos **FAG** e **10h** que os BMMCs desafiados com o periodontopatógeno demonstraram produção intracelular de NO significativamente superior àquela dos BMMCs estimulados ou não com LPS (ambos com $p < 0,0001$). Esta elevação não foi observada nos tempos de **3h**, **5h** e **24h** (Figura 9A).

5.9.2. *A. actinomycetemcomitans prejudica a liberação de NO pelos BMMCs no período de 5h, porém os BMMCs reverterem esta situação apresentando um pico de liberação de NO em 24h de desafio intracelular.*

Ao quantificarmos o NO extracelular secretado pelos BMMCs, através do método colorimétrico de Griess, verificou-se no período de **5h** que os BMMCs desafiados com *A. actinomycetemcomitans* secretaram os menores níveis de NO; além disso, tais níveis foram inferiores àqueles BMMCs estimulados ou não com LPS no mesmo período. Entretanto, após **24h** de desafio intracelular, o periodontopatógeno elevou os níveis de NO extracelular em comparação aos BMMCs estimulados ou não com LPS ($p < 0,02$) (Figura 9B).

Figura 9 - Produção intracelular e liberação de óxido nítrico por BMMCs estimulados ou não. (A) Média ($\pm$ desvio padrão) expressa em unidades relativas de fluorescência (RFU), referente à produção intracelular de óxido nítrico, após 3, 5, 10 e 24 horas de desafio, subsequente a um período de fagocitose de 1 hora (FAG). **(B)** Média ($\pm$ desvio padrão) expressa em micromolar (μ M), referente à liberação de óxido nítrico. Letras iguais diferem estatisticamente ($p < 0.05$). Três experimentos independentes. ANOVA Fatorial, Teste de Tukey.

5.10. Produção Intracelular e Liberação de Óxido Nítrico por MPs:**5.10.1. *A. actinomycetemcomitans* induz alta produção intracelular de NO em MPs após 3 horas de desafio intracelular.**

Avaliando a produção de NO pelos MPs desafiados com *A. actinomycetemcomitans* em relação àqueles estimulados ou não com LPS, observou-se que apenas após **3h** de desafio intracelular o periodontopatógeno elevou os níveis de NO intracelular significativamente quando comparados àqueles estimulados ou não com LPS ($p < 0.00001$) (Figura 10A).

5.10.2. *MPs liberam altos níveis de NO frente ao desafio com A. actinomycetemcomitans* apenas nos períodos de fagocitose e de 5 horas, com redução significativa após 24 horas de desafio.

Elevados níveis de NO extracelular, nos períodos **FAG** e **5h**, foram detectados entre os MPs desafiados com *A. actinomycetemcomitans* quando comparados com aqueles estimulados ou não com LPS ($p < 0,0002$). MPs desafiados com *A. actinomycetemcomitans* apresentaram um pico de liberação de NO extracelular após **5h** de desafio. Porém, após **24h** de desafio, os MPs desafiados com *A. actinomycetemcomitans* apresentaram menores níveis de NO em relação àqueles estimulados ou não com LPS ($p < 0,0005$) (Figura 10B).

Figura 10 - Produção intracelular e liberação de óxido nítrico por MPs estimulados ou não. (A) Média ($\pm$ desvio padrão) expressa em unidades relativas de fluorescência (RFU), referente à produção intracelular de óxido nítrico, após 3, 5, 10 e 24 horas de desafio, subsequente a um período de fagocitose de 1 hora (FAG). **(B)** Média ($\pm$ desvio padrão) expressa em micromolar (μ M), referente à liberação de óxido nítrico. Letras iguais diferem estatisticamente ($p < 0.05$). Três experimentos independentes. ANOVA Fatorial, Teste de Tukey.

5.11. Liberação de Peróxido de Hidrogênio por BMMCs e MPs

5.11.1. *A. actinomycetemcomitans* induz aumento na liberação de H_2O_2 em BMMCs nos períodos de fagocitose e de 5 horas e interfere em sua secreção após 3 horas de desafio intracelular.

Ao quantificarmos a liberação de peróxido de hidrogênio, através do kit Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase, observou-se que os BMMCs desafiados com *A. actinomycetemcomitans* nos tempos **FAG** e **5h** liberaram significativamente mais H_2O_2 que BMMCs não estimulados ($p=0,002$ e $p=0,008$, respectivamente). Porém, após **3h** de desafio, os BMMCs desafiados com *A. actinomycetemcomitans* apresentaram os menores níveis de H_2O_2 ; além disso, tais níveis foram inferiores àqueles obtidos pelos BMMCs estimulados com LPS e pelos BMMCs não estimulados, no mesmo período ($p<0,04$ e $p<0,0001$, respectivamente) (Figura 11A).

5.11.2. *A. actinomycetemcomitans* induz à liberação de H_2O_2 em MPs no período de fagocitose e nas primeiras 10 horas de desafio intracelular.

Avaliando a liberação de peróxido de hidrogênio pelos MPs desafiados com *A. actinomycetemcomitans* em relação àqueles MPs não estimulados, notou-se um aumento significativo nos níveis de H_2O_2 no período de fagocitose e nas primeiras 10 horas de desafio intracelular (**FAG** $p=0,0006$; **3h** $p=0,01$; **5h** $p=0,03$; **10h** $p=0,005$). Porém, esta elevação não foi observada em **24h**, constituindo o período de menor liberação de H_2O_2 pelos MPs desafiados com *A. actinomycetemcomitans* (Figura 11B).

Figura 11 - Liberação de peróxido de hidrogênio por BMMCs (A) ou MPs (B) estimulados ou não. Média ($\pm$ desvio padrão) expressa em micromolar (μM), referente à produção de peróxido de hidrogênio, após 3, 5, 10 e 24 horas de desafio *in vitro*, subsequente a um período de fagocitose de 1 hora (FAG). Letras iguais diferem estatisticamente ($p < 0.05$). Três experimentos independentes. ANOVA Fatorial, Teste de Tukey.

5.12. Maiores percentuais de crescimento de *A. actinomycetemcomitans* no interior de BMMCs ocorreram nos períodos de menor produção e liberação de mediadores microbicidas.

Ao compararmos a dinâmica temporal referente à produção intracelular de NO pelos BMMCs desafiados com *A. actinomycetemcomitans* com os percentuais de colônias viáveis do periodontopatógeno no interior dos BMMCs, observou-se forte correlação negativa no intervalo equivalente a **FAG** até **10h** ($r = -0,83$; $p < 0,001$). Porém, de **10h** para **24h**, essa correlação não foi significativa. Assim, os menores níveis de produção de NO coincidiram com os maiores percentuais de colônias viáveis do periodontopatógeno no interior dos BMMCs (Figura 12A).

Em relação à liberação de NO pelos BMMCs, também se observou forte correlação negativa ($r = -0,85$; $p < 0,0001$) ao longo das 24 horas de desafio. Assim, a redução na liberação de NO, no intervalo correspondente a **FAG** até **5h**, ocorreu simultaneamente ao aumento dos valores percentuais do periodontopatógeno no interior dos BMMCs. Interessantemente, o inverso ocorreu de **5h** até **24h**, ou seja, enquanto aumentava a liberação de NO pelos BMMCs ocorria importante redução no percentual de colônias viáveis de *A. actinomycetemcomitans* em seu interior (Figura 12B).

Após correlação da liberação temporal de H_2O_2 pelos BMMCs com o percentual de colônias viáveis da bactéria no seu interior, observou-se uma forte correlação negativa ($r = -0,84$; $p < 0,04$) apenas nos períodos iniciais de desafio (**FAG** e **3h**), nos quais a redução dos níveis de H_2O_2 coincidiu com o significativo aumento de colônias bacterianas no interior dos BMMCs. Entretanto nos períodos subsequentes de desafio não foi possível verificar esta mesma associação (Figura 12C).

Figura 12 - Correlação entre produção/liberação de mediadores microbicidas pelos BMMCs desafiados com *A. actinomycetemcomitans* e o percentual de colônias viáveis, desta bactéria, no interior de BMMCs. Média expressa em unidades relativas de fluorescência (RFU), referente à produção intracelular de NO **(A)**. Média expressa em micromolar (μM), referente à liberação de NO **(B)** e de H₂O₂ **(C)**, após 3, 5, 10 e 24 horas de desafio in vitro, subsequente a um período de fagocitose de 1 hora (FAG). Teste de Correlação de Pearson.

5.13. Após 10 horas de desafio, redução na produção de mediadores microbicidas em MPs ocorreu simultaneamente com o aumento de colônias de *A. actinomycetemcomitans* no seu interior.

Uma correlação negativa foi observada entre a produção de NO intracelular pelos MPs e o crescimento de *A. actinomycetemcomitans* no seu interior ($r = -0,69$; $p < 0,004$), de **FAG** até **5h**. A maior produção de NO pelos MPs após **3h** coincidiu com o menor percentual de colônias viáveis em seu interior. Embora no intervalo de **5h** até **24h** não tenha ocorrido correlação negativa, observou-se que os maiores valores percentuais de colônias bacterianas no interior de MPs estavam associados aos menores níveis de produção de NO por essas células (Figura 13A).

No entanto, diferentemente das avaliações com BMMCs, a liberação de NO por MPs desafiados com *A. actinomycetemcomitans* não demonstrou correlação negativa com o percentual de colônias bacterianas viáveis no interior dessas células. Apesar disso, foi possível verificar, nos períodos de **10h** e **24h**, que os maiores valores percentuais de *A. actinomycetemcomitans* estavam associados com os menores níveis de liberação de NO (Figura 13B).

Interessantemente, ao correlacionarmos os valores obtidos da liberação de H_2O_2 pelos MPs com o percentual de colônias de *A. actinomycetemcomitans* viáveis no interior dessas células, constatou-se uma forte correlação negativa ($r = -0,81$; $p < 0,0001$), ou seja, o aumento nos níveis de H_2O_2 , nos períodos iniciais (**FAG** e **3h**) coincidiu com uma expressiva redução da carga bacteriana no interior dos MPs. Ainda, a redução dos níveis de H_2O_2 , após **5h**, coincidiu com o significativo aumento no percentual de colônias do periodontopatógeno no interior dos MPs. (Figura 13C).

Figura 13 - Correlação entre produção/liberação de mediadores microbicidas pelos MPs desafiados com *A. actinomycetemcomitans* e o percentual de colônias viáveis, desta bactéria, no interior de MPs. Média expressa em unidades relativas de fluorescência (RFU), referente à produção intracelular de NO **(A)**. Média expressa em micromolar (μ M), referente à liberação de NO **(B)** e de H_2O_2 **(C)**, após 3, 5, 10 e 24 horas de desafio in vitro, subsequente a um período de fagocitose de 1 hora (FAG). Teste de Correlação de Pearson.

6 Discussão

6. DISCUSSÃO

Em 2013, nosso grupo de pesquisa foi pioneiro a fornecer evidências científicas de que MCs murinos fagocitam o periodontopatógeno *A. actinomycetemcomitans*, independente de opsonização via complemento, de forma tão eficaz quanto os macrófagos, sugerindo desta forma a participação destas células como fagócitos profissionais na patogênese da doença periodontal inflamatória induzida por placa dentobacteriana (LIMA et al., 2013). Este estudo in vitro demonstrou a capacidade fagocítica dos MCs contra *A. actinomycetemcomitans*, porém não foi avaliado se este mecanismo resultava em ação microbicida, desempenhando um papel protetor. Caso os MCs não sejam capazes de eliminar o periodontopatógeno, estas células podem atuar como reservatório bacteriano e liberar excessivamente citocinas pró-inflamatórias e enzimas proteolíticas, resultando em destruição tecidual, o que poderia ser relacionado com a progressão da doença periodontal inflamatória.

Assim, algumas questões precisam ser esclarecidas, tais como: os MCs teriam uma “maquinaria” intracelular eficaz para matar *A. actinomycetemcomitans*? Quais seriam os possíveis mediadores microbicidas produzidos e liberados pelos MCs durante o desafio intracelular com *A. actinomycetemcomitans*? Este periodontopatógeno conseguiria induzir apoptose nos MCs? Na presente pesquisa, objetivamos responder, em parte, tais questões por meio de ensaios in vitro utilizando células murinas. Os resultados obtidos serão discutidos a seguir.

Os mastócitos teriam uma “maquinaria” intracelular eficaz para matar A. actinomycetemcomitans?

A análise da atividade microbicida dos MCs murinos foi realizada através do ensaio de UFC de acordo com Wesolowski et al. (2012), o qual possibilitou investigarmos a viabilidade de *A. actinomycetemcomitans* após a sua internalização pelos MCs (WESOLOWSKI et al., 2012). Baseando-se nesta metodologia, nossos resultados confirmaram a eficaz capacidade microbicida intracelular dos MCs contra este periodontopatógeno, especialmente após 10 horas. Esta capacidade também

foi evidenciada por nós em oposição a *E. coli*, como demonstrado por outros autores (MALAVIYA et al., 1996; MALAVIYA et al., 1994; WESOLOWSKI et al., 2012).

A eficácia e a contribuição dos MCs na defesa do hospedeiro contra patógenos tornam-se cada vez mais reconhecidas nos últimos anos, denotando-os como poderosas células sentinelas do sistema imune (CHOI; ABRAHAM, 2015). Nossos achados adicionam-se a outros que também demonstraram, in vitro, esta capacidade dos MCs em eliminar bactérias, como por exemplo, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Francisella tularensis* e *Enterococcus faecalis* (KETAVARAPU et al., 2008; MALAVIYA et al., 1996; MALAVIYA et al., 1994; SCHEB-WETZEL et al., 2014; THATHIAH et al., 2011; VON KOCKRITZ-BLICKWEDE et al., 2008).

Diferentemente dos MCs, e de acordo com nossos achados, os MPs, embora tenham apresentado uma capacidade microbicida de, aproximadamente, 50% contra *A. actinomycetemcomitans*, no período de 3 horas, apresentaram um aumento tempo-dependente da carga bacteriana intracelular após este período de desafio. Em relação à atividade microbicida dos MPs em oposição a *E. coli*, também observamos uma melhor capacidade microbicida nos períodos iniciais, a qual foi significativa com 5 horas de desafio. A partir deste, houve um aumento intracelular da carga bacteriana. Esses nossos resultados corroboram estudos que também demonstraram o *killing* por MPs ocorrendo, principalmente, nas primeiras horas de contato com *A. actinomycetemcomitans* (SOL et al., 2013).

Baseado nestes resultados e considerando que os MCs eliminam 78% das bactérias fagocitadas após 24h e os MPs 50% após 3h, nós acreditamos que os MCs foram mais eficazes que os macrófagos na capacidade microbicida intracelular in vitro contra o periodontopatógeno. Vale ressaltar que estas diferentes dinâmicas de ação microbicida contra *A. actinomycetemcomitans*, entre MCs e MPs, podem representar um aspecto cooperativo do sistema imune, o qual se torna importante para a defesa do hospedeiro contra *A. actinomycetemcomitans*.

Não podemos descartar a possibilidade que a ineficaz ação microbicida intracelular demonstrada pelos MPs contra *A. actinomycetemcomitans* e *E. coli* tenha ocorrido pela falta de um estímulo in vitro, prévio ao desafio, como LPS ou

phorbol myristate acetate (PMA) ou ainda IFN- γ . Entretanto, em nosso modelo de infecção experimental in vitro, optamos pela não utilização de substâncias pré-ativadoras, já que isto resultaria em fácil desgranulação dos mastócitos.

A eficaz capacidade microbicida dos MCs em oposição a *A. actinomycetemcomitans* foi ainda reforçada quando comparamos a viabilidade bacteriana intracelular com o crescimento bacteriano livre de células, por meio dos valores percentuais referentes ao aumento/diminuição de colônias viáveis, nos intervalos de tempo de desafio. Desta forma, foi possível calcular o quanto os MCs impediram o crescimento bacteriano, usando como parâmetro o potencial de crescimento do *A. actinomycetemcomitans* nas suas condições in vitro favoráveis e sem interferências. Em resumo, a interferência dos MCs assumiu valores percentuais acima de 60%, atingindo um valor de 530% de **10h** para **24h**.

Por outro lado, seguindo este mesmo cálculo, a interferência no crescimento bacteriano pelos MPs não ultrapassou 109%; sendo que estas células impediram este crescimento em apenas 14% neste último intervalo. Adicionalmente, no intervalo de **5h** para **10h**, o ambiente intracelular dos MPs possibilitou um aumento de 132% de crescimento bacteriano, indicando que o seu ambiente intracelular propiciou melhores condições de crescimento ao periodontopatógeno, quando comparado à condição livre de macrófagos.

Em contrapartida, em todos os intervalos, o ambiente intracelular dos MCs não permitiu o alto crescimento bacteriano observado na condição livre dos BMMCs. Baseado nestes achados, inferimos que houve uma importante ação microbicida in vitro pelos MCs em oposição ao *A. actinomycetemcomitans*, com um desempenho superior aos macrófagos.

Resultados in vitro, similares aos nossos, foram observados por Ketavarapu et al., em 2008, os quais demonstraram replicação diminuída da bactéria *Francisella tularensis*, no interior dos MCs, em comparação ao exuberante crescimento observado em macrófagos. Os autores relacionaram esta diminuição com a reduzida internalização bacteriana pelos MCs (KETAVARAPU et al., 2008). Contudo, em nossa pesquisa, o número de colônias de *A. actinomycetemcomitans* observado no período de fagocitose foi semelhante em ambos os tipos celulares.

Sabe-se que a atividade microbicida dos fagócitos é continuidade de um processo que se inicia através do reconhecimento e da ingestão do patógeno, portanto as vias de indução dos fatores microbicidas, pelos fagócitos, dependem da interação fagócito-microrganismo. Os fagócitos, em especial os macrófagos e MCs, apresentam dois mecanismos básicos de reconhecimento microbiano: 1) opsoninas-dependente, via receptores para anticorpos IgG como o FcγR e para moléculas do sistema complemento, como CR3, e 2) opsoninas-independente, via receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que incluem as lectinas do tipo C (CLRs), os receptores de varredura (*scavengers*), os receptores semelhantes à NOD (NLRs) e os receptores tipo *Toll* (TLRs), os quais podem estar presentes em sua superfície, em vesículas endossômicas e no seu citoplasma (CHOI; ABRAHAM, 2015; FREEMAN; GRINSTEIN, 2014; MALAVIYA et al., 1999; MARSHALL; JAWDAT, 2004; TREVISAN et al., 2014). Assim, esta variabilidade de receptores, nestas células, promove o reconhecimento de diversos patógenos e de seus produtos, desencadeando diferentes respostas biológicas, incluindo atividades fagocitárias e antimicrobianas. Considerando que *A. actinomycetemcomitans* utilizado em nossa pesquisa não foi opsonizado, podemos inferir que as diferentes atividades microbicidas observadas são resultado de uma via de reconhecimento microbiana por meio de receptores opsoninas-independentes. Sendo assim, por esta via de reconhecimento, os MCs realizaram uma ação microbicida mais tardia, porém eficaz, enquanto os MPs parecem participar como refúgio bacteriano intracelular a partir de 5 horas.

De fato, estudo prévio realizado pelo nosso grupo demonstrou maiores valores percentuais de MCs com *A. actinomycetemcomitans* internalizados, após 1 hora, na ausência de opsonização com complemento, em comparação com células opsonizadas, sugerindo um importante reconhecimento bacteriano, pelos MCs, independente do receptor de complemento (LIMA et al., 2013). Porém, tem sido observado que bactérias internalizadas, por MCs, através da via opsoninas-independente, expressam adesinas que subvertem os mecanismos celulares microbicidas, promovendo assim a sobrevivência do microrganismo no interior dos fagócitos. Assim, essas células, passariam a servir como refúgio de bactérias viáveis, resultando em efeitos deletérios ao hospedeiro (FEGER et al., 2002; SHIN; ABRAHAM, 2001). Isso leva-nos a acreditar que o reconhecimento de *A.*

actinomycescomitans opsonizado, via complemento e/ou imunoglobulinas, poderia resultar em maior eficácia na ativação de mecanismos microbicidas em ambos os fagócitos estudados, principalmente nos MPs. Embora tenha sido verificada a importância dessas proteínas séricas na eliminação dos patógenos, recentemente Maekawa et al. (2014) demonstraram, em seu modelo in vivo, que a inibição do complemento traz benefícios clínicos a periodontite, uma vez que evita processos inflamatórios que levam a osteoclastogênese e perda óssea (MAEKAWA et al., 2014).

Quais seriam os possíveis mediadores microbicidas produzidos e liberados pelos mastócitos durante o desafio intracelular com *A. actinomycescomitans*?

A capacidade dos MCs em produzir e liberar agentes microbicidas contra microrganismos já está bem estabelecida na literatura. Recentemente, nosso grupo demonstrou a capacidade de MCs em fagocitar *Candida albicans* com concomitante produção de substâncias potencialmente candidacidas, tais como óxido nítrico e peróxido de hidrogênio (PINKE, 2014).

Na presente pesquisa, os resultados referentes à produção/liberação de óxido nítrico bem como, em menor proporção, de peróxido de hidrogênio foram concordantes com a capacidade microbicida dos MCs, sugerindo uma importante participação desses mediadores microbicidas no combate ao periodontopatógeno.

Em especial o NO, produzido e liberado pelos MCs, mostrou ter significativa influência na viabilidade de *A. actinomycescomitans*, uma vez que houve forte correlação negativa entre o percentual de colônias viáveis no interior dos MCs e os níveis de NO, principalmente àqueles liberados. Assim, os maiores níveis de liberação de NO, observado em **24h**, coincidiram com o melhor momento microbicida dos MCs. Em concordância, observamos um aumento significativo de produção de NO pelos MCs, de **5h** para **10h**. Uma vez produzido em grande quantidade, esse reativo altamente lipofílico, é então secretado e acumulado no meio extracelular. Em relação à redução na produção de NO pelos MCs, de **10h**

para **24h**, acreditamos fortemente que ocorreu devido à diminuição significativa da carga bacteriana intracelular, também observada no mesmo período.

Embora a produção/liberação deste potente agente microbicida pelos MCs revele forte associação com a eliminação do periodontopatógeno internalizado por essas células, outros trabalhos, *in vivo* ou utilizando tecidos parafinados, demonstram a forte associação entre NO e a destruição dos tecidos periodontais inflamados (BATISTA et al., 2002; KENDALL et al., 2001; LEITAO et al., 2005; POORSATTAR BEJEH-MIR et al., 2014; RODINI et al., 2008). Assim, extrapolando os achados científicos (incluindo os nossos *in vitro*) para a doença periodontal em humanos, a produção/liberação de NO pelos MCs, na referida doença, pode ser ambígua, ou seja, ora protege o indivíduo contra *A. actinomycetemcomitans* através da sua morte, ora contribui para uma maior destruição e progressão clínica da doença através da ativação de células osteoclastogênicas e metaloproteinases.

No presente trabalho, objetivamos também avaliar a liberação do peróxido de hidrogênio, pelos MCs. Este agente microbicida apresentou expressiva liberação contra *A. actinomycetemcomitans* nos períodos **FAG** e **5h**, em comparação a liberação não estimulada. Entretanto, apenas do período **FAG** para **3h**, detectamos uma correlação negativa entre sua liberação e a morte bacteriana pelos MCs, na qual os MCs demonstraram acentuada redução de H₂O₂ e, simultaneamente, o aumento dos valores percentuais de bactérias viáveis no seu interior.

Em resumo, podemos inferir que a ação microbicida observada pelos MCs até 24 horas ocorre, principalmente, via NO. A falta de ação microbicida nas fases iniciais de desafio intracelular pode ser decorrente da falha em ambas as vias microbicidas, NO e H₂O₂.

Em relação aos macrófagos, acreditamos que sua produção/liberação de NO foi prejudicada pela ação de *A. actinomycetemcomitans*, nos períodos finais avaliados, corroborando Fernandes et al. (2008), que detectaram que a toxina distensora citoletal, produzida por este periodontopatógeno, inibiu significativamente a produção de NO em macrófagos peritoneais murinos (FERNANDES et al., 2008). Porém, se essa estagnação nos níveis de produção/liberação de NO, observada em

nosso estudo, no intervalo de **10h** até **24h**, fosse revertida pelos MPs, possivelmente a carga bacteriana intracelular diminuiria, assim como ocorreu em MCs.

De forma semelhante ocorreu com a liberação de H_2O_2 pelos MPs; sua expressiva redução, a partir de **5h** até **24h**, ocorreu em paralelo com o exuberante aumento da carga bacteriana intracelular nos MPs. Esses dados sugerem que este periodontopatógeno pode subverter estes importantes mecanismos utilizados pelos MPs. A possibilidade de que *A. actinomycetemcomitans* produza fatores de virulência que inibam a produção e a liberação de potentes agentes microbicidas é suportada por evidências recentes que demonstram que esta bactéria produz enzimas desintoxicantes, como por exemplo, a catalase, que transforma o H_2O_2 em $H_2O + O_2$, promovendo assim sua maior sobrevivência e resistência à resposta imune inata (RAMSEY; WHITELEY, 2009; STACY et al., 2014).

Apesar de ambos os tipos celulares produzirem e secretarem tais mediadores microbicidas, não podemos descartar ainda a possibilidade que estes fagócitos possam ter utilizado outras vias, que não os reativos de oxigênio e nitrogênio, na tentativa de eliminar o periodontopatógeno. Uma das formas, recentemente descrita, seria através da formação de armadilhas extracelulares, a partir da qual a célula expelle filamentos de DNA associados a proteínas antimicrobianas, como LL-37, e β -defensinas, que têm a capacidade de matar e/ou conter a proliferação bacteriana extracelular local, caracterizando um mecanismo microbicida extracelular independente da fagocitose, observado em células como neutrófilos, macrófagos, MCs e eosinófilos (LIU et al., 2014; VON KOCKRITZ-BLICKWEDE; NIZET, 2009). Ainda, outras habilidades dos MCs, que não foram avaliadas no presente estudo, podem favorecer a defesa antimicrobiana como a desgranulação de uma grande gama de mediadores estocados em seus grânulos e a síntese de citocinas e quimiocinas. Exemplificando, Doener et. al., 2013, demonstraram que $TNF-\alpha$ e GM-CSF derivados de MCs atuam na ativação de neutrófilos, aumentando sua fagocitose e geração de espécies reativas de oxigênio (DOENER et al., 2013).

Este periodontopatógeno conseguiria induzir apoptose nos mastócitos?

Uma vez que nossas células foram desafiadas em diferentes tempos com *A. actinomycetemcomitans*; propusemo-nos a investigar a manutenção da viabilidade de MCs e MPs após o desafio, por meio de análise da apoptose. Nós constatamos que esta bactéria induz mecanismos iniciais, porém reversíveis, de apoptose nos MCs e este fenômeno foi mais evidente nos períodos mais prolongados de desafio, ou seja, 10 e 24 horas. Porém, mesmo após o desafio bacteriano por 24 horas, 90% dos MCs mantiveram sua viabilidade celular, uma vez que não apresentaram degradação em sua membrana plasmática (apoptose tardia). Dados similares aos MCs também foram verificados entre os MPs. Esses achados permitem-nos concluir que a cepa de *A. actinomycetemcomitans*, utilizada por nós, não apresentou atividade leucotóxica nos BMMCs in vitro. Em contrapartida, alguns autores observaram esta leucotoxicidade em outras células do sistema imune (RABIN et al., 2009; YOSHIMOTO et al., 2014), a qual é considerada um importante mecanismo de supressão da resposta imune (FRAUNHOLZ; SINHA, 2012; GAO; KWAIK, 2000).

A alta viabilidade observada em ambos os tipos celulares, em oposição a *A. actinomycetemcomitans*, possivelmente, ocorreu pelo fato da cepa ATTC 29523 (sorotipo a), utilizada em nossa pesquisa, não apresentar alta leucotoxicidade. Entretanto, Umeda et al. (2013) demonstraram que a interação desta cepa com células epiteliais, após 24 horas, promoveu o aumento da expressão de genes relacionados a fatores de virulência, como por exemplo, *cdtB* (indutor de apoptose) e *orf859* (associado a sobrevivência bacteriana intracelular) (UMEDA et al., 2013). Assim, não podemos descartar a ocorrência de tal expressão em nossos ensaios, visto que altos valores percentuais de MCs e MPs em apoptose inicial foram constatados, principalmente, após 24 horas de desafio intracelular.

O processo de apoptose promove diversas modificações morfológicas e bioquímicas nas células. Dentre essas modificações, podemos citar a exposição de resíduos de fosfatidilserina, um fosfolípido que, em células saudáveis, mantém-se apenas na face interna da bicamada lipídica da membrana plasmática (POON et al., 2014; RYSAVY et al., 2014). A proteína anticoagulante Anexina V foi utilizada, em

nosso trabalho, para analisar o processo apoptótico inicial, uma vez que possui a capacidade de se ligar especificamente aos resíduos de fosfatidilserina (VERMES et al., 1995). Entretanto, alguns trabalhos também demonstraram que a externalização de resíduos de fosfatidilserina ocorre durante a desgranulação dos MCs. Isto sugere, desta forma, que MCs positivos para Anexina podem representar células desgranuladas (GOTH; ADAMS; KNOOHUIZEN, 1971; MARTIN et al., 2000; RYSAVY et al., 2014; TREVISAN et al., 2014). Assim, não podemos descartar a possibilidade de que o aumento percentual de MCs positivos para Anexina, principalmente após 24h de desafio intracelular, represente uma maior desgranulação mastocitária estimulada pelo periodontopatógeno. Como não utilizamos um agente estimulante de desgranulação em MCs, como por exemplo, o composto 48/80, torna-se impossível afirmar tal possibilidade.

Considerando a possibilidade da maior desgranulação, vale destacar as funções da histamina, uma das principais substâncias presentes nos grânulos dos MCs. Essa importante substância vasoativa possui a capacidade de iniciar os fenômenos vasculares e exsudativos da resposta inflamatória (THURMOND; GELFAND; DUNFORD, 2008). Entretanto, alguns trabalhos in vivo, utilizando camundongos *knockout* para histamina, demonstraram que a histamina promove o atraso na eliminação bacteriana (HORI et al., 2002; OHTSU; WATANABE, 2003). Adicionalmente, Azuma et al. (2001) demonstraram, em seu trabalho in vitro, a potente ação inibidora deste mediador na quimiotaxia, fagocitose e produção de ânion superóxido (AZUMA et al., 2001).

Tais evidências concordam com estudos abordando a DP. A cimetidina, antagonista do receptor H₂, preveniu a periodontite induzida experimentalmente (HASTURK et al., 2006), e melhorou a função antibacteriana de neutrófilos presentes no fluido crevicular, na periodontite em humanos (VAN DYKE et al., 2005). Além disso, cimetidina exerce um efeito benéfico sobre a doença periodontal em ratos, diminuindo a relação de RANKL/OPG no tecido conjuntivo gengival e reduzindo a reabsorção óssea alveolar (LONGHINI et al., 2014).

Apesar de neste trabalho não ter sido avaliada a produção de mediadores pró-inflamatórios pelos MCs, o sobrenadante dos ensaios com ambos os tipos celulares, foi armazenado a -80°C e pretendemos utilizá-los para futuras análises,

investigando a participação dos MCs ativados por *A. actinomycetemcomitans*, como fontes de importantes mediadores químicos e de citocinas imunorreguladoras.

Em resumo, este estudo in vitro possibilitou, pela primeira vez, a verificação da capacidade microbicida intracelular dos MCs contra *A. actinomycetemcomitans*, bem como a produção e liberação de potentes agentes microbicidas por estas células contra o periodontopatógeno, comprovando a atuação dos MCs como fagócitos profissionais, inclusive em melhores condições das observadas pelos macrófagos. Desta forma, extrapolando nossos resultados in vitro para a doença periodontal humana induzida por placa dentobacteriana, podemos sugerir a importância dessas células nos mecanismos de defesa presentes nesta doença. Portanto, este estudo, pode auxiliar no direcionamento de novas estratégias de prevenção, assim como no desenvolvimento de novos procedimentos terapêuticos para as doenças periodontais inflamatórias.

7 Conclusões

7. CONCLUSÕES

Com base na metodologia empregada e no que foi exposto e discutido nos capítulos anteriores, pôde-se concluir que:

✓ Os mastócitos murinos mostraram-se eficientes quanto a sua capacidade microbida intracelular frente ao periodontopatógeno *A. actinomycetemcomitans*, especialmente após 10 horas de desafio.

✓ A produção/liberação de óxido nítrico bem como, em menor proporção, de peróxido de hidrogênio pelos mastócitos foi concordante com a sua capacidade microbida.

✓ Os mastócitos foram mais eficazes que os macrófagos na capacidade microbida intracelular in vitro contra o periodontopatógeno.

Referências

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. . Hipersensibilidade imediata. In: (Ed.). **Imunologia Celular e Molecular**. 6. Rio de Janeiro: Saunders/Elsevier, 2008. p.441-462.

ABRAHAM, S. N.; MALAVIYA, R. Mast cells in infection and immunity. **Infect Immun**, v. 65, n. 9, p. 3501-8, Sep 1997.

AMIN, K. The role of mast cells in allergic inflammation. **Respir Med**, v. 106, n. 1, p. 9-14, Jan 2012.

ANAND, P. et al. Mast cells: an expanding pathophysiological role from allergy to other disorders. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 385, n. 7, p. 657-70, Jul 2012.

APPLEQUIST, S. E.; WALLIN, R. P.; LJUNGGREN, H. G. Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. **Int Immunol**, v. 14, n. 9, p. 1065-74, Sep 2002.

ASARO, J. P. et al. Experimental periodontal disease. Immediate hypersensitivity. **J Periodontol**, v. 54, n. 1, p. 23-8, Jan 1983.

AZUMA, Y. et al. Histamine inhibits chemotaxis, phagocytosis, superoxide anion production, and the production of TNFalpha and IL-12 by macrophages via H2-receptors. **Int Immunopharmacol**, v. 1, n. 9-10, p. 1867-75, Sep 2001.

BATISTA, A. C.; RODINI, C. O.; LARA, V. S. Quantification of mast cells in different stages of human periodontal disease. **Oral Dis**, v. 11, n. 4, p. 249-54, Jul 2005.

BATISTA, A. C. et al. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. **Oral Dis**, v. 8, n. 5, p. 254-60, Sep 2002.

BEREZOW, A. B.; DARVEAU, R. P. Microbial shift and periodontitis. **Periodontol 2000**, v. 55, n. 1, p. 36-47, Feb 2011.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. **J Periodontal Res**, v. 28, n. 6 Pt 2, p. 500-10, Nov 1993.

BLIX, I. J.; HELGELAND, K. LPS from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and production of nitric oxide in murine macrophages J774. **Eur J Oral Sci**, v. 106, n. 1, p. 576-81, Feb 1998.

BOGDAN, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. **Trends Immunol**, v. 36, n. 3, p. 161-78, Mar 2015.

BRASIL, S. Condições de saúde bucal da população brasileira: 2009-2010. Resultados principais. **Ministério da Saúde**, 2010.

- BRENNAN, P. A.; THOMAS, G. J.; LANGDON, J. D. The role of nitric oxide in oral diseases. **Arch Oral Biol**, v. 48, n. 2, p. 93-100, Feb 2003.
- CARRANZA, F. A., JR.; CABRINI, R. L. Mast cells in human gingiva. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 8, n. 10, p. 1093-9, Oct 1955.
- CHEN, Q. et al. Steroid receptor coactivator 3 is required for clearing bacteria and repressing inflammatory response in Escherichia coli-induced septic peritonitis. **J Immunol**, v. 185, n. 9, p. 5444-52, Nov 1 2010.
- CHOI, H. W.; ABRAHAM, S. N. Mast cell mediator responses and their suppression by pathogenic and commensal microorganisms. **Mol Immunol**, v. 63, n. 1, p. 74-9, Jan 2015.
- CHRISTERSSON, L. A. et al. Tissue localization of Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontitis. II. Correlation between immunofluorescence and culture techniques. **J Periodontol**, v. 58, n. 8, p. 540-5, Aug 1987.
- COLOMBO, A. V. et al. Identification of intracellular oral species within human crevicular epithelial cells from subjects with chronic periodontitis by fluorescence in situ hybridization. **J Periodontal Res**, v. 42, n. 3, p. 236-43, Jun 2007.
- CRAIG, R. G. et al. Relationship of destructive periodontal disease to the acute-phase response. **J Periodontol**, v. 74, n. 7, p. 1007-16, Jul 2003.
- DIETMANN, A. et al. Effects of Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin on endothelial cells. **Microb Pathog**, v. 61-62, p. 43-50, Aug-Sep 2013.
- DOENER, F. et al. Mast cell-derived mediators promote murine neutrophil effector functions. **Int Immunol**, v. 25, n. 10, p. 553-61, Oct 2013.
- EBERSOLE, J. L.; CAPPELLI, D. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. **Periodontol 2000**, v. 23, p. 19-49, Jun 2000.
- FEGER, F. et al. The role of mast cells in host defense and their subversion by bacterial pathogens. **Trends Immunol**, v. 23, n. 3, p. 151-8, Mar 2002.
- FERNANDES, K. P. et al. Inhibition of interferon-gamma-induced nitric oxide production in endotoxin-activated macrophages by cytolethal distending toxin. **Oral Microbiol Immunol**, v. 23, n. 5, p. 360-6, Oct 2008.
- FINE, D. H. et al. How we got attached to Actinobacillus actinomycetemcomitans: A model for infectious diseases. **Periodontol 2000**, v. 42, p. 114-57, 2006.
- FIVES-TAYLOR, P. M. et al. Virulence factors of Actinobacillus actinomycetemcomitans. **Periodontol 2000**, v. 20, p. 136-67, Jun 1999.
- FREEMAN, S. A.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. **Immunol Rev**, v. 262, n. 1, p. 193-215, Nov 2014.

-
- FREITAS, M.; LIMA, J. L.; FERNANDES, E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. **Anal Chim Acta**, v. 649, n. 1, p. 8-23, Sep 1 2009.
- GARCIA, X.; STEIN, F. Nitric oxide. **Semin Pediatr Infect Dis**, v. 17, n. 2, p. 55-7, Apr 2006.
- GARLET, G. P. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. **J Dent Res**, v. 89, n. 12, p. 1349-63, Dec 2010.
- GARLET, G. P. et al. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. **J Periodontal Res**, v. 38, n. 2, p. 210-7, Apr 2003.
- GELANI, V. et al. The role of toll-like receptor 2 in the recognition of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **J Periodontol**, v. 80, n. 12, p. 2010-9, Dec 2009.
- GEMMELL, E.; YAMAZAKI, K.; SEYMOUR, G. J. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 13, n. 1, p. 17-34, 2002.
- GENCO, R. J. Host responses in periodontal diseases: current concepts. **J Periodontol**, v. 63, n. 4 Suppl, p. 338-55, Apr 1992.
- GIANNOBILE, W. V. Host-response therapeutics for periodontal diseases. **J Periodontol**, v. 79, n. 8 Suppl, p. 1592-600, Aug 2008.
- GILCHRIST, M.; MCCAULEY, S. D.; BEFUS, A. D. Expression, localization, and regulation of NOS in human mast cell lines: effects on leukotriene production. **Blood**, v. 104, n. 2, p. 462-9, Jul 15 2004.
- GOTH, A.; ADAMS, H. R.; KNOOHUIZEN, M. Phosphatidylserine: selective enhancer of histamine release. **Science**, v. 173, n. 4001, p. 1034-5, Sep 10 1971.
- GRAVES, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. **J Periodontol**, v. 79, n. 8 Suppl, p. 1585-91, Aug 2008.
- GUNHAN, M. et al. Mast cells in periodontal disease. **Ann Dent**, v. 50, n. 1, p. 25-9, Summer 1991.
- HASTURK, H. et al. Topical H2 antagonist prevents periodontitis in a rabbit model. **Infect Immun**, v. 74, n. 4, p. 2402-14, Apr 2006.
- HAUBEK, D. The highly leukotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: evolutionary aspects, epidemiology and etiological role in aggressive periodontitis. **APMIS Suppl**, n. 130, p. 1-53, Sep 2010.
- HAUBEK, D. et al. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. **Lancet**, v. 371, n. 9608, p. 237-42, Jan 19 2008.

HENDERSON, B.; WARD, J. M.; READY, D. Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans: a triple A* periodontopathogen? **Periodontol** **2000**, v. 54, n. 1, p. 78-105, Oct 2010.

HINKLE, D. E.; WIERSMA, W.; JURIS, S. G. Applied statistics for the behavioral sciences. **Boston, Mass.**, v. 1, n. 1, 2003.

HORI, Y. et al. Accelerated clearance of Escherichia coli in experimental peritonitis of histamine-deficient mice. **J Immunol**, v. 169, n. 4, p. 1978-83, Aug 15 2002.

HUANG, S. et al. Mast Cell Degranulation in Human Periodontitis. **J Periodontol**, Apr 17 2012.

HUANG, S. et al. Quantification of tryptase-TIM-3 double-positive mast cells in human chronic periodontitis. **Arch Oral Biol**, v. 59, n. 6, p. 654-61, Jun 2014.

JEFFCOAT, M. K. et al. Treatment of periodontal disease in beagles with lodoxamide ethyl, an inhibitor of mast cell release. **J Periodontal Res**, v. 20, n. 5, p. 532-41, Sep 1985.

JI, S.; CHOI, Y. S.; CHOI, Y. Bacterial invasion and persistence: critical events in the pathogenesis of periodontitis? **J Periodontal Res**, Dec 8 2014.

JOHANSSON, A. Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin: a powerful tool with capacity to cause imbalance in the host inflammatory response. **Toxins (Basel)**, v. 3, n. 3, p. 242-59, Mar 2011.

KACHLANY, S. C. Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin: from threat to therapy. **J Dent Res**, v. 89, n. 6, p. 561-70, Jun 2010.

KENDALL, H. K.; MARSHALL, R. I.; BARTOLD, P. M. Nitric oxide and tissue destruction. **Oral Dis**, v. 7, n. 1, p. 2-10, Jan 2001.

KETAVARAPU, J. M. et al. Mast cells inhibit intramacrophage Francisella tularensis replication via contact and secreted products including IL-4. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 27, p. 9313-8, Jul 8 2008.

KINANE, D. F.; ATTSTROM, R.; EUROPEAN WORKSHOP IN PERIODONTOLOGY GROUP, B. Advances in the pathogenesis of periodontitis. Group B consensus report of the fifth European Workshop in Periodontology. **J Clin Periodontol**, v. 32 Suppl 6, p. 130-1, 2005.

KINANE, D. F.; LAPPIN, D. F. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. **Acta Odontol Scand**, v. 59, n. 3, p. 154-60, Jun 2001.

KODA, W. et al. Evidence of the participation of peribiliary mast cells in regulation of the peribiliary vascular plexus along the intrahepatic biliary tree. **Lab Invest**, v. 80, n. 7, p. 1007-17, Jul 2000.

-
- KOLENBRANDER, P. E. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. **Annu Rev Microbiol**, v. 54, p. 413-37, 2000.
- KORNMAN, K. S.; VAN DYKE, T. E. Bringing light to the heat: "inflammation and periodontal diseases: a reappraisal". **J Periodontol**, v. 79, n. 8, p. 1313, Aug 2008.
- LEITAO, R. F. et al. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v. 76, n. 6, p. 956-63, Jun 2005.
- LIMA, H. G. et al. Mast cells act as phagocytes against the periodontopathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **J Periodontol**, v. 84, n. 2, p. 265-72, Feb 2013.
- LIU, P. et al. *Escherichia coli* and *Candida albicans* induced macrophage extracellular trap-like structures with limited microbicidal activity. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e90042, 2014.
- LOESCHE, W. J. Bacterial mediators in periodontal disease. **Clin Infect Dis**, v. 16 Suppl 4, p. S203-10, Jun 1993.
- LONGHINI, R. et al. Cimetidine reduces alveolar bone loss in induced periodontitis in rat molars. **J Periodontol**, v. 85, n. 8, p. 1115-25, Aug 2014.
- MAEKAWA, T. et al. Genetic and intervention studies implicating complement C3 as a major target for the treatment of periodontitis. **J Immunol**, v. 192, n. 12, p. 6020-7, Jun 15 2014.
- MALAVIYA, R.; ABRAHAM, S. N. Clinical implications of mast cell-bacteria interaction. **J Mol Med (Berl)**, v. 76, n. 9, p. 617-23, Aug 1998.
- MALAVIYA, R.; ABRAHAM, S. N. Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. **J Leukoc Biol**, v. 67, n. 6, p. 841-6, Jun 2000.
- MALAVIYA, R.; ABRAHAM, S. N. Mast cell modulation of immune responses to bacteria. **Immunol Rev**, v. 179, p. 16-24, Feb 2001.
- MALAVIYA, R. et al. The mast cell tumor necrosis factor alpha response to FimH-expressing *Escherichia coli* is mediated by the glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CD48. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 14, p. 8110-5, Jul 6 1999.
- MALAVIYA, R.; GEORGES, A. Regulation of mast cell-mediated innate immunity during early response to bacterial infection. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 22, n. 2, p. 189-204, Apr 2002.
- MALAVIYA, R. et al. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. **Nature**, v. 381, n. 6577, p. 77-80, May 2 1996.
- MALAVIYA, R. et al. Mast cell phagocytosis of FimH-expressing enterobacteria. **J Immunol**, v. 152, n. 4, p. 1907-14, Feb 15 1994.

-
- MARSHALL, J. S. Mast-cell responses to pathogens. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 10, p. 787-99, Oct 2004.
- MARSHALL, J. S.; JAWDAT, D. M. Mast cells in innate immunity. **J Allergy Clin Immunol**, v. 114, n. 1, p. 21-7, Jul 2004.
- MARTIN, S. et al. Immunologic stimulation of mast cells leads to the reversible exposure of phosphatidylserine in the absence of apoptosis. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 123, n. 3, p. 249-58, Nov 2000.
- METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Physiol Rev**, v. 77, n. 4, p. 1033-79, Oct 1997.
- MURCIANO, C. et al. Influence of aging on murine neutrophil and macrophage function against *Candida albicans*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 53, n. 2, p. 214-21, Jul 2008.
- MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 11, p. 723-37, Nov 2011.
- NUNN, M. E. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. **Periodontol 2000**, v. 32, p. 11-23, 2003.
- OFFENBACHER, S.; BARROS, S. P.; BECK, J. D. Rethinking periodontal inflammation. **J Periodontol**, v. 79, n. 8 Suppl, p. 1577-84, Aug 2008.
- OHLRICH, E. J.; CULLINAN, M. P.; SEYMOUR, G. J. The immunopathogenesis of periodontal disease. **Aust Dent J**, v. 54 Suppl 1, p. S2-10, Sep 2009.
- OHTSU, H.; WATANABE, T. New functions of histamine found in histidine decarboxylase gene knockout mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 305, n. 3, p. 443-7, Jun 6 2003.
- OOSHIMA, T.; NISHIYAMA, N.; TAMURA, K. Accidentally induced periodontitis in primary dentition: longitudinal examinations of periodontal bacteria and clinical conditions. **Int J Paediatr Dent**, v. 13, n. 3, p. 193-7, May 2003.
- PAGE, R. C. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. **Ann Periodontol**, v. 3, n. 1, p. 108-20, Jul 1998.
- PATUREL, L. et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* endocarditis. **Clin Microbiol Infect**, v. 10, n. 2, p. 98-118, Feb 2004.
- PEISER, L. et al. Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of *Escherichia coli*: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions in vitro. **Infect Immun**, v. 68, n. 4, p. 1953-63, Apr 2000.
- PINKE, K. H. Participação dos mastócitos e seus receptores TLR2 e dectina-1 na defesa contra *Candida albicans*: fagocitose e produção/liberação de óxido nítrico e de peróxido de hidrogênio. 2014.

- POON, I. K. et al. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 3, p. 166-80, Mar 2014.
- POORSATTAR BEJEH-MIR, A. et al. Diagnostic Role of Salivary and GCF Nitrite, Nitrate and Nitric Oxide to Distinguish Healthy Periodontium from Gingivitis and Periodontitis. **Int J Mol Cell Med**, v. 3, n. 3, p. 138-45, Summer 2014.
- PRESHAW, P. M.; FOSTER, N.; TAYLOR, J. J. Cross-susceptibility between periodontal disease and type 2 diabetes mellitus: an immunobiological perspective. **Periodontol** 2000, v. 45, p. 138-57, 2007.
- QU, Z. et al. Synthesis of basic fibroblast growth factor by murine mast cells. Regulation by transforming growth factor beta, tumor necrosis factor alpha, and stem cell factor. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 115, n. 1, p. 47-54, Jan 1998.
- RABIN, S. D.; FLITTON, J. G.; DEMUTH, D. R. Aggregatibacter actinomycetemcomitans cytolethal distending toxin induces apoptosis in nonproliferating macrophages by a phosphatase-independent mechanism. **Infect Immun**, v. 77, n. 8, p. 3161-9, Aug 2009.
- RAMSEY, M. M.; WHITELEY, M. Polymicrobial interactions stimulate resistance to host innate immunity through metabolite perception. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 5, p. 1578-83, Feb 3 2009.
- RAO, K. N.; BROWN, M. A. Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1143, p. 83-104, Nov 2008.
- ROBINSON, L. P.; DE MARCO, T. J. Alteration of mast cell densities in experimentally inflamed human gingivae. **J Periodontol**, v. 43, n. 10, p. 614-22, Oct 1972.
- RODINI, C. O. et al. Morphologic evaluation and expression of matrix metalloproteinases-2 and 9 and nitric oxide during experimental periodontal disease in rat. **J Mol Histol**, v. 39, n. 3, p. 275-82, Jun 2008.
- RUDNEY, J. D.; CHEN, R.; SEDGEWICK, G. J. Intracellular Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in buccal epithelial cells collected from human subjects. **Infect Immun**, v. 69, n. 4, p. 2700-7, Apr 2001.
- RYSAVY, N. M. et al. Beyond apoptosis: the mechanism and function of phosphatidylserine asymmetry in the membrane of activating mast cells. **Bioarchitecture**, v. 4, n. 4-5, p. 127-37, 2014.
- SAITO, A. et al. Significance of serum antibody against surface antigens of Actinobacillus actinomycetemcomitans in patients with adult periodontitis. **Oral Microbiol Immunol**, v. 8, n. 3, p. 146-53, Jun 1993.
- SAKAI, V. T. et al. Prevalence of four putative periodontopathic bacteria in saliva of a group of Brazilian children with mixed dentition: 1-year longitudinal study. **Int J Paediatr Dent**, v. 17, n. 3, p. 192-9, May 2007.

-
- SBORDONE, L.; BORTOLAIA, C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. **Clin Oral Investig**, v. 7, n. 4, p. 181-8, Dec 2003.
- SCHEB-WETZEL, M. et al. New insights into the antimicrobial effect of mast cells against *Enterococcus faecalis*. **Infect Immun**, v. 82, n. 11, p. 4496-507, Nov 2014.
- SCHENKEIN, H. A. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. **Periodontol 2000**, v. 40, p. 77-93, 2006.
- SEWNATH, M. E. et al. IL-10-deficient mice demonstrate multiple organ failure and increased mortality during *Escherichia coli* peritonitis despite an accelerated bacterial clearance. **J Immunol**, v. 166, n. 10, p. 6323-31, May 15 2001.
- SEYMOUR, G. J. et al. Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanisms. **J Periodontal Res**, v. 28, n. 6 Pt 2, p. 478-86, Nov 1993.
- SHAPIRO, S.; ULMANSKY, M.; SCHEUER, M. Mast cell population in gingiva affected by chronic destructive periodontal disease. **J Periodontol**, v. 40, n. 5, p. 276-8, May 1969.
- SHIN, J. S.; ABRAHAM, S. N. Co-option of endocytic functions of cellular caveolae by pathogens. **Immunology**, v. 102, n. 1, p. 2-7, Jan 2001.
- SKOKOS, D. et al. Mast cell-dependent B and T lymphocyte activation is mediated by the secretion of immunologically active exosomes. **J Immunol**, v. 166, n. 2, p. 868-76, Jan 15 2001.
- SLOTS, J. et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Association, serology, leukotoxicity, and treatment. **J Periodontal Res**, v. 17, n. 5, p. 447-8, Sep 1982.
- SOL, A. et al. LL-37 opsonizes and inhibits biofilm formation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* at subbactericidal concentrations. **Infect Immun**, v. 81, n. 10, p. 3577-85, Oct 2013.
- SPITZNAGEL, J., JR.; KRAIG, E.; KOLODRUBETZ, D. Regulation of leukotoxin in leukotoxic and nonleukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect Immun**, v. 59, n. 4, p. 1394-401, Apr 1991.
- STACY, A. et al. Bacterial fight-and-flight responses enhance virulence in a polymicrobial infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 21, p. 7819-24, May 27 2014.
- STEINSVOLL, S.; HELGELAND, K.; SCHENCK, K. Mast cells--a role in periodontal diseases? **J Clin Periodontol**, v. 31, n. 6, p. 413-9, Jun 2004.
- SUSIN, C. et al. Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. **J Periodontol**, v. 75, n. 7, p. 1033-41, Jul 2004.

-
- SUZUKI, Y. et al. Fc epsilon RI signaling of mast cells activates intracellular production of hydrogen peroxide: role in the regulation of calcium signals. **J Immunol**, v. 171, n. 11, p. 6119-27, Dec 1 2003.
- SWINDLE, E. J.; HUNT, J. A.; COLEMAN, J. W. A comparison of reactive oxygen species generation by rat peritoneal macrophages and mast cells using the highly sensitive real-time chemiluminescent probe pholasin: inhibition of antigen-induced mast cell degranulation by macrophage-derived hydrogen peroxide. **J Immunol**, v. 169, n. 10, p. 5866-73, Nov 15 2002.
- SWINDLE, E. J.; METCALFE, D. D. The role of reactive oxygen species and nitric oxide in mast cell-dependent inflammatory processes. **Immunol Rev**, v. 217, p. 186-205, Jun 2007.
- SWINDLE, E. J.; METCALFE, D. D.; COLEMAN, J. W. Rodent and human mast cells produce functionally significant intracellular reactive oxygen species but not nitric oxide. **J Biol Chem**, v. 279, n. 47, p. 48751-9, Nov 19 2004.
- TAYLOR, M. L.; METCALFE, D. D. Mast cells in allergy and host defense. **Allergy Asthma Proc**, v. 22, n. 3, p. 115-9, May-Jun 2001.
- THATHIAH, P. et al. Non-FcepsilonR bearing mast cells secrete sufficient interleukin-4 to control Francisella tularensis replication within macrophages. **Cytokine**, v. 55, n. 2, p. 211-20, Aug 2011.
- THURMOND, R. L.; GELFAND, E. W.; DUNFORD, P. J. The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 1, p. 41-53, Jan 2008.
- TIETZE, K. et al. Differences in innate immune responses upon stimulation with gram-positive and gram-negative bacteria. **J Periodontal Res**, v. 41, n. 5, p. 447-54, Oct 2006.
- TREVISAN, E. et al. Mast cells kill Candida albicans in the extracellular environment but spare ingested fungi from death. **Inflammation**, v. 37, n. 6, p. 2174-89, Dec 2014.
- TRIPATHI, P. Nitric oxide and immune response. **Indian J Biochem Biophys**, v. 44, n. 5, p. 310-9, Oct 2007.
- TRIPATHI, P.; KASHYAP, L.; SINGH, V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 51, n. 3, p. 443-52, Dec 2007.
- UGAR-CANKAL, D.; OZMERIC, N. A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases. **Clin Chim Acta**, v. 366, n. 1-2, p. 90-100, Apr 2006.
- UMEDA, J. E. et al. Differential transcription of virulence genes in Aggregatibacter actinomycetemcomitans serotypes. **J Oral Microbiol**, v. 5, 2013.
- VAN DYKE, T. E. et al. Effect of topical cimetidine rinse on gingival crevicular neutrophil leukocyte function. **J Periodontol**, v. 76, n. 6, p. 998-1005, Jun 2005.

VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J Immunol Methods**, v. 184, n. 1, p. 39-51, Jul 17 1995.

VILLA, I. et al. Capacity of mouse mast cells to prime T cells and to induce specific antibody responses in vivo. **Immunology**, v. 102, n. 2, p. 165-72, Feb 2001.

VON KOCKRITZ-BLICKWEDE, M. et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. **Blood**, v. 111, n. 6, p. 3070-80, Mar 15 2008.

VON KOCKRITZ-BLICKWEDE, M.; NIZET, V. Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. **J Mol Med (Berl)**, v. 87, n. 8, p. 775-83, Aug 2009.

WALSH, L. J. et al. Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. **J Oral Pathol Med**, v. 24, n. 6, p. 266-72, Jul 1995.

WESOŁOWSKI, J.; CALDWELL, V.; PAUMET, F. A novel function for SNAP29 (synaptosomal-associated protein of 29 kDa) in mast cell phagocytosis. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49886, 2012.

WIERZBICKI, M.; BRZEZINSKA-BLASZCZYK, E. Diverse effects of bacterial cell wall components on mast cell degranulation, cysteinyl leukotriene generation and migration. **Microbiol Immunol**, v. 53, n. 12, p. 694-703, Dec 2009.

YOSHIMARU, T. et al. Silver activates mast cells through reactive oxygen species production and a thiol-sensitive store-independent Ca²⁺ influx. **Free Radic Biol Med**, v. 40, n. 11, p. 1949-59, Jun 1 2006.

Anexos

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 002/2013

Bauru, 18 de fevereiro de 2013.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Mecanismos de defesa dos mastócitos contra o periodontopatógeno *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: atividades microbicida e imunomodulatória**, de autoria de **Heliton Gustavo de Lima**, foi enviado ao relator para avaliação e considerado APROVADO em reunião desta Comissão realizada **nesta data**.

Solicitamos que ao final da pesquisa seja enviado, para avaliação desta Comissão, um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Vanessa Soares Lara

Docente do Departamento de Estomatologia = *Patologista*

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73

e-mail: mferrari@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356

<http://www.fob.usp.br>