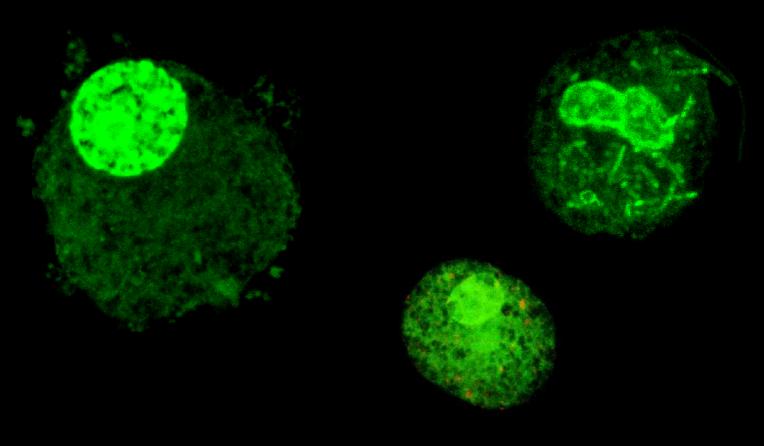
## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU



# Avaliação da capacidade fagocítica de mastócitos frente ao periodontopatógeno Aggregatibacter actinomycetemcomitans



BAURU 2011

#### **HELITON GUSTAVO DE LIMA**

# Avaliação da capacidade fagocítica de mastócitos frente ao periodontopatógeno *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas.

Área de concentração: Patologia Bucal. Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Soares Lara.

Versão corrigida

Lima, Heliton Gustavo

L628a

Avaliação da capacidade fagocítica de mastócitos frente ao periodontopatógeno Aggregatibacter actinomycetemcomitans – Bauru, 2011.

103 p.: il.; 31cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Soares Lara

**Nota:** A versão original desta dissertação 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: 28/2010 Data: 13 de Agosto de 2010.

#### **DADOS CURRICULARES**

#### HELITON GUSTAVO DE LIMA

**Nascimento** 31/12/1987.

Rolândia - PR.

**Filiação** Jurandir Alves de Lima.

Maria Aparecida Alves de Lima.

**2005-2008** 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.

Associação SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa

Odontológica.

#### **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a todos que, de uma forma ou outra, me apoiaram a trilhar este caminho, principalmente aos meus pais, Cida e Jurandir, exemplos de coragem e determinação, juntos me ensinaram a lutar pelos meus sonhos.

#### **AGRADECIMENTOS**

À **Deus**, por permitir que eu chegasse até aqui, me concedendo toda sabedoria e discernimento nestes anos de estudo.

À minha mãe, **Maria Aparecida Alves de Lima**, exemplo de garra coragem e fé. Jamais se curva em meio às tribulações, sem dúvida minha maior incentivadora e conselheira em tudo. Admiro sua doação, bondade, humildade, perseverança, competência e alegria de viver. Agradeço pelo seu amor incondicional.

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.

À minha orientadora **Profa. Dra. Vanessa Soares Lara** por seu brilhantismo ao articular ideias, elaborar projetos e por saber administrar bem seu humilde tempo de filha, mãe, esposa e professora, sendo sempre competente e eficiente em seu trabalho. Agradeço também por ter apostado e confiado no meu potencial, e na minha imensa vontade de trabalhar com algo relacionado à doença periodontal. Acredito que nestes dois anos pude realmente conhecê-la e saber o quanto posso contar com sua amizade e seus ensinamentos. Tê-la como orientadora, só pode ter sido presente de Deus. Muito obrigado pelo carinho, atenção e paciência.

Aos professores da Disciplina de Patologia da FOB, **Dr. Luís Antônio de Assis Taveira**, um exemplo de humildade a ser seguido, obrigado pelos ensinamentos e orientações, **Dra. Denise Tostes Oliveira**, agradeço imensamente a todos os conselhos e ensinamentos que contribuíram para minha maturidade acadêmica e **Dr. Alberto Consolaro** pelos saberes compartilhados e pela harmoniosa convivência.

Ao Prof. **Dr. Mario Julio Avila-Campos**, do Laboratório de Anaeróbios do ICB/USP, que nos disponibilizou as cepas das bactérias 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 à **Prof. Dra. Maria Célia Jamur**, 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.

À **Dra. Maura Rosane Valério Ikoma** por toda disponibilidade e atenção em nos receber no laboratório de citometria de fluxo do Hemonúcleo Regional de Jaú, para utilização do citômetro, possibilitando realizarmos a imunofenotipagem da cultura celular.

À Marcimara Penitente e Camila Marques Bertolucci pela contribuição em meu trabalho através das análises de citometria de fluxo.

À **Dra. Daniela Carlos** pelo grande carinho e atenção em nos responder os diversos e-mails, sanando todas as dúvidas referentes à cultura de mastócitos.

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

Ao **Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto**, por todo apoio e incentivo além de permitir a utilização dos equipamentos do Centro Integrado de Pesquisa (CIP).

Aos Professores. **Dr. Heitor Marques Honório** e **Dr. José Roberto Pereira Lauris**, pela colaboração na realização das análises estatísticas;

À **Ms. Márcia S. Z. Graeff**, pela imensa contribuição no meu trabalho através da microscopia confocal, manuseando sempre com grande destreza e profissionalismo o aparelho, possibilitando-nos, desta forma, uma rica e minuciosa análise qualitativa deste trabalho.

Aos meus amigos de trabalho do CIP: **Marcelo Milanda** pela diligência em preparar e manusear as cepas de bactérias para os experimentos. **Rafaela Alves da Silva** grande parceira e amiga, **Renato Pereira Murback** e **Neusa Caetano Barbosa**, obrigado pelo carinho, e pelos momentos de diversão.

Aos **graduandos da turma XLVIII** que através do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) foi construído um laço de amizade, além de me proporcionarem uma experiência única em sala de aula e no laboratório, o meu muito obrigado.

À **Profa. Dra. Linda Wang** que sempre me incentivou e apoiou, fazendo com que eu jamais desistisse do sonho da carreira acadêmica, sei que devo muito a você. Obrigado!

À **Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade** pelo 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.

À **Dra. Camila Peres Buzalaf** pela atenção e carinho, mostrando-se sempre solícita em esclarecer dúvidas, e até mesmo dar ideias, foi uma honra trabalhar com você.

À Karen Henriette Pinke, mais que amiga considero como irmã, principalmente quando o assunto é mastócitos. Juntos, aprendemos a padronizar a cultura e adequá-la de acordo com as nossas condições. E não foi diferente na nossa amizade, quando vimos, um já tinha se adequado ao outro e a afinidade já era mais que percebida. Muito obrigado por ter feito os meus dias de mestrado mais emocionantes.

À **Taiane Priscila Gardizani**, meu braço direito, ajudou-me com grande delicadeza, competência, carinho e companheirismo durante os ensaios de fagocitose, além de me proporcionar sua excelente companhia e amizade. Aprendi a ser mais organizado com você. Obrigado!

Às amigas e parceiras **Ana Regina Casaroto**, **Adriana dos Santos Caetano** e **Priscila Lie Tobouti**, pessoas que pude conviver intensamente nesses dois anos de mestrado, vivenciamos altas aventuras, demos muitas gargalhadas e é claro nos desentendemos também, mas tudo isso só veio a fortalecer nossa amizade. Como foi bom tê-las perto de mim, sei que nossa amizade será para vida toda.

Às queridas amigas **Fernanda Mombrini Pigatti** e **Maria Carolina Martins Mussi,** por todo carinho e ombro amigo que me forneceram nestes dois anos de mestrado, vocês apareceram como pedras preciosas na minha vida vieram embelezar. Valeu pela parceria e pelos momentos de alegria.

A todos os colegas de pós-graduação da área de Patologia: Alexandre Garcia, Bruna Vilardi, Bruno Aiello Barbosa, Carine Ervolino de Oliveira, Diego Mauricio Bravo Calderón, Érika S. L. Orti-Raduan, Maria Carolina Vaz Goulart, Mariana Santos, Natália Garcia, Simone Faustino, Sylvie Brener, Taísa Vilardi, pelos bons momentos compartilhados.

Aos queridos amigos de pós-graduação: Patrícia Freitas-Faria, Samira Salmeron, Elen Tolentino, Eloísa M. A. Soria, Camila Cardoso, Kellen Tjioe, Kellen Gasque, Janaina Maniezo, Magda Paula Nascimento, Lidiane Yumi Sawasaki, Daniela Manoel, Cristiane A. P. de Carvalho, Fábio Silva de Carvalho, obrigado por todo companheirismo, carinho e amizade.

Ao amigo e companheiro **Aroldo dos Santos Almeida** "in memorian" pela amizade adquirida em poucos meses de convívio na qual pude conhecer um rapaz bondoso e acolhedor que me recebeu em seu pequeno apartamento logo que cheguei a Bauru.

A todos meus queridos **amigos de graduação** em especial Natália Valarini e Nicole Brunozi, grandes companheiras e amigas, que sempre me incentivaram a seguir carreira acadêmica. Obrigado por fazerem parte da minha vida.

Aos funcionários e ex-funcionários da Patologia Maria Cristina Carrara Filippi, Fátima Aparecida Silveira, Carlos Alberto da Silva, Carla C. B. de Oliveira e Marilza Dias de Almeida, que me proporcionaram grandes momentos de alegria e descontração. Obrigado por fazer meus dias em Bauru mais felizes.

Ao técnico, **André Luís da Silva** por todo carinho e atenção e pela colaboração na etapa de padronização deste trabalho.

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.

A todos os **amigos do Ministério Universidades Renovadas (MUR)** que me acolheram com grande amor e carinho, sem vocês esses dois anos de mestrado seriam "sem graça".

A todos os meus **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.

#### **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

À Faculdade de Odontologia de Bauru – USP na pessoa do excelentíssimo Diretor **Prof. Dr. José Carlos Pereira**.

À Comissão da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa do Presidente, **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**.

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 disciplina.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio à pesquisa (2009/14152-1), possibilitando a obtenção de reagentes para a realização deste trabalho.



#### **RESUMO**

As doenças periodontais afetam os tecidos de suporte dos dentes e são desencadeadas por microrganismos que possuem a capacidade de invadir os tecidos periodontais. A evolução desta doença é influenciada pela resposta inflamatória e imunológica do hospedeiro e envolve a participação de diversos tipos celulares. Atualmente, existem evidências de que os mastócitos, além de outras funções, possuem a capacidade de eliminar bactérias, através da fagocitose. Assim sendo, este estudo teve por objetivo avaliar a capacidade fagocítica dos mastócitos frente ao periodontopatógeno A. actinomycetemcomitans, além de comparar sua capacidade fagocítica com a dos macrófagos, considerados fagócitos profissionais. Para este fim, foram realizados ensaios fagocíticos in vitro utilizando mastócitos e macrófagos murinos, desafiados ora com A. actinomycetemcomitans ora com Escherichia coli, opsonizados ou não, sob diferentes proporções célula:bactérias. Após 1 hora de desafio, as células foram coradas com laranja de acridina e avaliadas qualitativamente utilizando-se microscópio de varredura confocal a laser e quantitativamente através do microscópio de fluorescência convencional. Nossos resultados demonstraram que os mastócitos murinos se mostraram eficientes quanto a sua capacidade fagocítica frente a A. actinomycetemcomitans. Os valores percentuais de mastócitos com A. actinomycetemcomitans internalizados, na ausência de opsonização com complemento, foram maiores que aqueles na presença da opsonização, sugerindo a participação de receptores opsoninasindependentes no reconhecimento deste patógeno pelos mastócitos, além do receptor de complemento tipo 3 (CR3). Comparando os dois tipos celulares, verificou-se que ambas as células apresentaram importante atividade fagocítica contra A. actinomycetemcomitans, porém os valores percentuais de mastócitos com bactérias internalizadas sem complemento foram maiores que aqueles de macrófagos com bactérias internalizadas com complemento, em uma das proporções (1:10). Os resultados deste trabalho sugerem o papel dos mastócitos como fagócitos profissionais na patogênese da doença periodontal induzida por placa dentobacteriana.

Palavras-chave: Mastócitos. Aggregatibacter actinomycetemcomitans. Fagocitose.

#### **ABSTRACT**

## Evaluation of the phagocytic ability of mast cells against the periodontopathogens *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Periodontal diseases affect the supporting tissues of the teeth and are triggered by microorganisms which are capable of invading periodontal tissues. The evolution of this disease is influenced by inflammatory and immune response of the host and involves the participation of different cell types. Currently, there is evidence that mast cells, among other functions, have the ability to eliminate bacteria by phagocytosis. Thus, this study aimed to evaluate the phagocytic ability of mast cells against the periodontopathogens A. actinomycetemcomitans, and compare with the phagocytic capacity of macrophages, which are considered professional phagocytes. Therefore, in vitro phagocytic assays were conducted using murine mast cells and macrophages, challenged with A. actinomycetemcomitans or Escherichia coli, at the same time, opsonized or not, under different proportions cell: bacteria. After 1 hour of challenge, cells were stained with acridine orange and qualitatively assessed by using a confocal laser scanning electron microscope and quantitatively by the conventional scanning fluorescence microscope. The results demonstrated that phagocytic ability murine mast cells was effective against Α. actinomycetemcomitans. The percentages of mast cells with Α. actinomycetemcomitans internalized in the absence of opsonization with complement, were higher than those in the presence of opsonization, suggesting the involvement of opsonin-independent receptors in recognition of this pathogen by mast cells, as well as complement receptor type 3 (CR3). Comparing the two cell types, it was observed that both cells showed significant phagocytic activity against A. actinomycetemcomitans, however, the percentages of mast cells with internalized bacteria without complement were higher than those of macrophages with internalized bacteria with complement, in one of the proportions (1:10). The results suggest the role of mast cells as professional phagocytes in the pathogenesis of periodontal disease induced by dental plaque.

Key words: Mast cells. Aggregatibacter actinomycetemcomitans. Phagocytosis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

#### - FIGURAS

Figura 1 - Caracterização morfológica e imunofenotipagem dos	
mastócitos murinos	55
Figura 2 - Fagocitose de mastócitos frente a A.	
actinomycetemcomitans e E. coli.	66
- GRÁFICOS	
- GRAFICOS	
Gráfico 1 - Porcentagem de BMMC com <i>A. actinomycetemcomitans</i>	
internalizados ou não.	58
Gráfico 2 - Porcentagem de Macrófagos peritoneais murinos com A.	
actinomycetemcomitans internalizados ou não	60
Gráfico 3 - Comparação da capacidade fagocítica contra A.	
actinomycetemcomitans, opsonizados ou não, entre os dois	
tipos celulares	62
Orifica A. Maiorintonnalissa and A. addinantonalisma and	
Gráfico 4 - Maior internalização de <i>A. actinomycetemcomitans</i> , após	63
desafio por 1 hora, apresentada pelos dois tipos celulares	03
Gráfico 5 - Análise fagocítica dos diferentes tipos celulares frente a	
E. coli	65

#### LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

μg/mL microgramas por mililitro

μL microlitro μM micromolar

A.a Aggregatibacter actinomycetemcomitans

ATCC American Type Culture Collection

BSA Bovine Serum Albumin (albumina bovina sérica)

CO<sub>2</sub> Dióxido de carbono (gás carbônico)

DNA Desoxiribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)

ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay (Ensaio imunoenzimático)

FACS Fluorescence activated cell sorted (Citometria de Fluxo)

FceRI Receptor de alta afinidade para imunoglobulina E

FITC Fluoresceína isoticianato

g gramas

HTI Hipersensibilidade do tipo imediata

IFN-γ Interferon gama

IL Interleucina

INPM Instituto Nacional de Pesos e Medidas

LPS Lipopolissacarídeos

mg/L miligrama por litro

mL mililitro

ng/mL nanogramas por mililitros

NK Natural Killer

NS Não Significante

PBS Phosphate Buffer Saline (Tampão fosfato-salina)

pg/mL picogramas por mililitros

pH potencial de Hidrogênio iônico

rpm rotação por minuto

RPMI Roswell Park Memorial Institute (Meio de Cultura)

P Nível de Significância

SCF Stem Cell Fator (Fator de Células Tronco)

SFB Soro Fetal Bovino
Th T helper (T auxiliar)

TLR Toll like receptor (receptor do tipo Toll)

TNF-α Tumoral necrosis factor alpha (Fator de necrose tumoral alfa)

xg Vezes o valor da gravidade

#### **LISTA DE SÍMBOLOS**

% porcento

o grau

> maior

≤ menor ou igual

### SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	Doença Periodontal Inflamatória	25
2.2	Aggregatibacter actinomycetemcomitans	27
2.3	Resposta Imune da Doença Periodontal Inflamatória	28
2.4	Mastócitos	30
2.5	Mastócitos na Doença Periodontal Inflamatória	32
2.6	Mastócitos e Fagocitose	34
3	PROPOSIÇÃO	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	Animais de experimentação	43
4.2	Isolamento, diferenciação e expansão dos mastócitos	43
4.3	Caracterização morfológica e imunofenotipagem de	
	BMMC	44
4.4	Cultura de Aggregatibacter actinomycetemcomitans e	
	Escherichia coli	45
4.5	Ensaio de fagocitose: BMMC versus A.	
	actinomycetemcomitans e BMMC versus E. Coli	46
4.6	Obtenção e cultura dos macrófagos murinos	48
4.7	Ensaio de fagocitose: macrófagos versus A.	
	actinomycetemcomitans e macrófagos versus E. coli	49
4.8	Análise estatística	50

5	RESULTADOS51
5.1	Caracterização morfológica e imunofenotipagem de
F 0	BMMC
5.2	Capacidade fagocítica in vitro de BMMC versus A. actinomycetemcomitans57
5.3	Capacidade fagocítica in vitro de macrófagos peritoneais
	murinos versus A. actinomycetemcomitans59
5.4	Análise comparativa da capacidade fagocítica in vitro de
	BMMC e de macrófagos peritoneais murinos, frente a A.
	actinomycetemcomitans60
5.5	Análise comparativa da capacidade fagocítica in vitro de
	BMMC e de macrófagos peritoneais murinos, frente a E.
	coli64
6	DISCUSSÃO67
7	CONCLUSÕES77
	REFERÊNCIAS81
	APÊNDICES95
	ANEXOS 101

1 Introdução

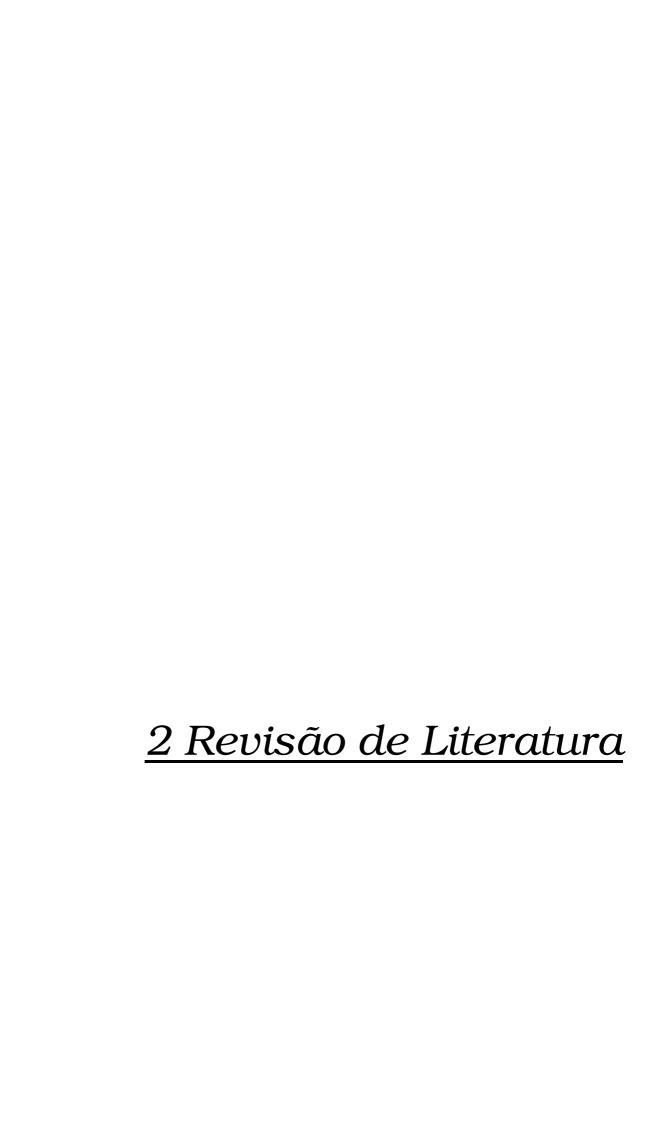
# 1 INTRODUÇÃO

As doenças periodontais (DPs) inflamatórias induzidas por placa dentobacteriana afetam os tecidos de suporte dos dentes e são desencadeadas por microrganismos, denominados periodontopatógenos, em especial os gram-negativos anaeróbios e facultativos, como o Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A. actinomycetemcomitans), que possui a capacidade de invadir os tecidos periodontais e estabelecer uma infecção (SPITZNAGEL, et al., 1991; HAUBEK, et al., 2008). Sabe-se que a evolução destas doenças depende da resposta imune do hospedeiro, envolvendo inúmeros tipos celulares e seus mediadores químicos (KINANE; LAPPIN, 2001; KINANE; ATTSTROM, 2005). Entre as células encontradas nos tecidos periodontais, os mastócitos têm sido observados tanto no periodonto normal quanto inflamado, em diferentes quantidades e em vários locais (CARRANZA; CABRINI, 1955; SHAPIRO; ULMANSKY; SCHEUER, 1969; ROBINSON; DE MARCO, 1972; ASARO et al., 1983; JEFFCOAT et al., 1985; GÜNHAN et al., 1991; WALSH et al., 1995; BATISTA; RODINI; LARA, 2005).

Atualmente, existem evidências de que os mastócitos participam de inúmeras funções nas DPs inflamatórias, tais como, liberação de citocinas pró-inflamatórias e imunorreguladoras que ativam outras células do sistema imune; contribuindo, desta forma, para o desenvolvimento e a amplificação da resposta de defesa (STEINSVOLL; HELGELAND; SCHENCK, 2004). Estudos *in vitro* têm revelado a capacidade destas células em eliminar bactérias, através de mecanismos dependente ou independente da fagocitose (VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, et al., 2008).

Embora existam trabalhos demonstrando a capacidade fagocítica e microbicida dos mastócitos frente a bactérias gram-negativas, não há relatos na literatura sobre a participação dos mastócitos na eliminação de periodontopatógenos via fagocitose. Uma vez que *A. actinomycetemcomitans* constitui uma das bactérias amplamente relacionadas à DPs inflamatórias, torna-se importante um maior conhecimento das capacidades fagocítica e microbicida destas células em resposta a *A. actinomycetemcomitans*, caracterizando aspectos da participação dos

mastócitos dentobacter	imunopatogênese	e das	DPs	inflamatórias	induzidas	por	placa



### **2 REVISÃO DE LITERATURA**

#### 2.1 Doença Periodontal Inflamatória

As doenças periodontais (DPs) inflamatórias são alterações crônicas dos tecidos de proteção e sustentação dos órgãos dentais, tendo sua etiologia relacionada ao biofilme microbiano aderido à superfície dental (GENCO, 1992; LOESCHE, 1993; KINANE; LAPPIN, 2001). Estas alterações inflamatórias acometem tanto os tecidos de proteção (gengivite ou doença gengival induzida por placa dentobacteriana) quanto os de sustentação dos dentes (periodontites crônica e agressiva), sendo caracterizadas, em suas fases mais avançadas, principalmente por destruição do ligamento periodontal, perda da crista óssea alveolar, migração apical do epitélio juncional e formação de bolsa periodontal (LISTGARTEN, 1986; WILLIAMS, 1990; GENCO, 1992).

Em termos epidemiológicos, as diferentes modalidades de DPs atingem praticamente a totalidade da população, sendo as periodontites consideradas enfermidades ósseas mais prevalentes em humanos, e importante causa de perda dentária. Atualmente, as DPs têm sido descritas como fatores modificadores da saúde sistêmica dos pacientes (AAP 1996; PAGE, 1998; AAP 1999; EBERSOLE; CAPPELLI, 2000; SUSIN et al. 2004), sendo, portanto, uma doença de relevância para a saúde publica.

O agente etiológico primário das DPs inflamatórias é a placa dentobacteriana, composta principalmente por bactérias colonizadoras da superfície dentária, inicialmente gram-positivas, dispostas sob a forma de biofilmes microbianos. A organização destes biofilmes confere condições favoráveis ao desenvolvimento microbiano, uma vez que atuam como barreira, retendo substâncias produzidas pelas próprias bactérias e, ao mesmo tempo, protegendo-as de fatores de defesa do organismo hospedeiro e de agentes antimicrobianos externos (COESTERTON, 1987; HAFFAJEE, SOCRANSKY, 1994; LISTGARTEN, 1994). A partir do crescente acúmulo de microrganismos na placa dentobacteriana na margem gengival, alterações no microambiente do biofilme possibilitam a

colonização de bactérias gram-negativas. Assim, os componentes típicos destas espécies, como os lipopolissacarídeos (LPS), interagem com receptores de superfície dos queratinócitos do epitélio sulcular, atingindo o tecido conjuntivo fibroso subjacente, onde entram em contato com fibroblastos, células endoteliais e leucócitos. Clinicamente, essa fase inicial reflete alterações inflamatórias restritas ao periodonto de proteção, caracterizadas como vermelhidão e inchaço da margem gengival, sangramento, quando provocado, bem como alterações no contorno gengival, perda de adesão tecidual e aumento do fluxo do fluido gengival, no intuito de diluir e eliminar o agressor. Estabelece-se, então, o quadro de gengivite induzida por placa dentobacteriana, que não envolve perda de inserção periodontal e é reversível perante a remoção da referida placa (ATTSTRON 1971; HORTON; MERGENHAGEN, 1974: LEHNER, AAP. OPPENHEIN; 1974: 1999). Microscopicamente, as alterações teciduais observadas na gengivite induzida por placa dentobacteriana incluem proliferação da camada basal do epitélio juncional, levando à migração celular apical e lateral, dilatação dos vasos sanguíneos adjacentes ao epitélio juncional, destruição progressiva de fibras colágenas, alterações citopatológicas nos fibroblastos residentes e infiltrado inflamatório/imune progressivo (PAGE; SCHROEDER, 1976).

A persistência dos biofilmes microbianos em íntima proximidade aos tecidos periodontais humanos, possibilitando contínuo estímulo antigênico, torna a resposta inflamatória, inicialmente aguda, na qual predominam alterações vasculoexsudativas e degradação de colágeno, em lesão crônica, com proliferação do epitélio juncional abaixo da junção cemento-esmalte, formando-se uma bolsa periodontal, além de contínua destruição do colágeno, ativação de fibroblastos e fagócitos, acúmulo de células polimorfonucleares (PMNs) nos epitélios juncional e bolsa periodontal, denso infiltrado inflamatório mononuclear (MN), predominantemente linfoplasmocitário, e perda de suporte dentário caracterizado pela reabsorção óssea alveolar. Dessa forma, a periodontite crônica pode ser definida como uma doença tipicamente crônica e continuamente progressiva, que apresenta repentinos indícios de atividade (HORTON; OPPENHEIN; MERGENHAGEN, 1974; PAGE; SCHROEDER, 1976; SOCRANSKY, 1984; JEFFCOAT; REDDY, 1991). A constante modificação do microambiente local possibilita o desenvolvimento de uma placa dentobacteriana subgengival, caracterizada por uma microbiota principalmente gram-negativa anaeróbia e de espiroquetas, que constituem as principais bactérias periodontopatogênicas, como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (antigamente referido como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* – NØRSKOV-LAURITSEN; KILIAN, 2006), *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* (DZINK et al., 1985; DZINK; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1988; KOLENBRANDER; LONDON, 1993). O desenvolvimento de uma microbiota periodontopatogênica e a continuidade do acúmulo de placa dentobacteriana resultam em uma grande quantidade de produtos microbianos; esta intensa carga antigênica no sulco gengival, por sua vez, ocasiona aumento marcante na dimensão da resposta do hospedeiro.

#### 2.2 Aggregatibacter actinomycetemcomitans

As DPs inflamatórias diferem de outras infecções por não serem causadas por um único microrganismo, mas por um grupo de bactérias. Embora mais de 500 espécies bacterianas possam ser isoladas da cavidade bucal, apenas uma pequena fração tem potencial para causar a destruição óssea periodontal (OOSHIMA et al., 2003; TIETZE et al., 2006; SAKAI et al., 2007). Especificamente, as espécies *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) possuem a capacidade de invadir os tecidos periodontais e estabelecer uma infecção (SCHENKEIN, 2006).

A bactéria *A. actinomycetemcomitans* 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. A virulência de tal microrganismo é relacionada à sua marcante capacidade de invasão tecidual, produção de diversas proteases e de uma potente leucotoxina, especialmente por determinados clones extremamente virulentos, como JP2 (SPITZNAGEL, et al., 1991; HAUBEK, et al., 2008). Acredita-se que tais fatores de virulência interfiram na resposta imune contra tal patógeno, resultando em maior dificuldade na obtenção de sucesso no tratamento de pacientes infectados com A. *actinomycetemcomitans*, assim como potencializam os efeitos sistêmicos da infecção periodontal (SAITO, et al., 1993; FIVES-TAYLOR, et al., 1995; WILSON, et al., 1995; FIVES-TAYLOR, et al., 1999).

Embora as doenças periodontais inflamatórias resultem, 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 (GENCO, 1992; BIRKEDAL-HANSEN, 1993; GEMMEL; SEYMOUR; YAMAZAKI, 2002).

#### 2.3 Resposta Imune na Doença Periodontal Inflamatória

A evolução das DPs inflamatórias é influenciada pela resposta inflamatória e imunológica do hospedeiro e envolve a participação de diversos tipos celulares, residentes e migrantes, os quais produzem uma vasta gama de mediadores, como as quimiocinas, citocinas e enzimas, que atuam no microambiente local modulando a resposta do hospedeiro em busca do controle da infecção (SEYMOUR et al., 1993; GARLET et al., 2003; BATISTA; RODINI; LARA, 2005; OHLRICH, 2009).

Dentre as diferentes células, os queratinócitos gengivais humanos participam da resposta imune inata contra os periodontopatógenos, atuando como primeira linha de defesa. Estudos revelam que estas células, quando estimuladas com substâncias derivadas de bactérias periodontopatogênicas, ligantes do receptor *Toll-like*, liberam diversas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, com importante função na imunidade inata e adaptativa (SANDROS, et al., 2000; TAKAHASHI, et al., 2010).

A partir da demonstração da presença de plasmócitos produtores de imunoglobulinas nos tecidos gengivais de pacientes com doença periodontal inflamatória (BRANDTZAEG; KRAUS, 1965), obteve-se a primeira evidência direta da participação de mecanismos imunes adaptativos na patogênese da doença. Desta forma, acredita-se que a resposta do hospedeiro para o desenvolvimento de doenças periodontais é dependente de linfócitos. Tanto linfócitos T quanto B estão presentes em grande número nos tecidos periodontais em condições patológicas. Desde então, vários estudos fortalecem a hipótese de que há uma alteração na população linfocitária presente na doença periodontal inflamatória, ou seja, a mudança de gengivite para periodontite envolve uma substituição de uma lesão predominantemente rica em células T para uma lesão abundante em células

B/plasmócitos (SEYMOUR; POWELL; DAVIES, 1979; GEMMEL; YAMAZAKI; SEYMOUR, 2002; OHLRICH; CULLINAN; SEYMOUR, 2009). Ainda, na transição de gengivite para periodontite, muitos autores relatam uma diminuição na proporção de células CD4+ com relação às células CD8+. Pode-se sugerir então que, na doença periodontal inflamatória, há um desequilíbrio imunorregulatório local (TAUBMAN et al., 1984; COLE; SEYMOUR; POWELL, 1987; STOUFI et al., 1987; OKADA et al., 1988; ZADEH; NICHOLS; MIYASAKI, 1999; GEMMEL; YAMAZAKI; SEYMOUR, 2002).

A regulação da resposta imune nas DPs inflamatórias depende da produção de citocinas pelas diferentes subpopulações de linfócitos T helper (Th), que atuam atenuando ou potencializando a reação inflamatória nos tecidos periodontais e, desta forma, determinando a atividade ou a latência das lesões periodontais (BERGLUNDH, et al., 2002; TENG, 2003; YAMAZAKI, et al., 2003; GEMMELL; SEYMOUR, 2004). As respostas mediadas por linfócitos Th podem exibir um padrão Th1, que consiste predominantemente de uma resposta imune celular e pró-inflamatória, com a presença característica de citocinas como fator de necrose tumoral-α (TNF-α) e interferon-γ (IFN-γ), ou um padrão do tipo Th2, com características anti-inflamatórias, uma resposta imune predominantemente humoral e com a presença de citocinas como interleucina-10 (IL-10) (MOORE; O'GARRA, et al.,1993). Tal polarização é determinada por citocinas típicas de cada padrão, envolvendo a participação de quimiocinas e tipos celulares característicos.

Nas últimas duas décadas, as células Th1 e Th2 constituíam os principais fatores do desenvolvimento das DPs inflamatórias associadas à placa dentobacteriana; porém nos últimos anos um terceiro grupo de células foi caracterizado, com a denominação de Th17, as quais seletivamente produzem interleucina (IL)-17. Esta citocina, por sua vez, induz a secreção de IL-6, IL-8 e prostaglandina E2 (PGE2). Portanto, as células Th17 desempenham um papel fundamental na regulação da inflamação. Acredita-se ainda que a IL-17 afete também a atividade osteoclástica e, portanto, modula a reabsorção óssea. Recentemente, células Th17, bem como as células T reguladoras (Treg), têm sido encontradas no tecido periodontal, levantando a possibilidade dessas células participarem da imunorregulação da doença periodontal (OHLRICH, 2009).

Atualmente, há um crescente alerta para as interações potenciais entre mastócitos e outros componentes do sistema imune, contribuindo na modulação dos eventos celulares e humorais dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas (WELLE, 1997; VILLA et al., 2001) e, assim, provavelmente participando da patogênese de condições inflamatórias como a doença periodontal inflamatória.

#### 2.4 Mastócitos

Os mastócitos são elementos-chave do sistema imune, cujo papel fisiológico tem gerado muitos debates científicos. Todos os mastócitos são derivados de progenitores da medula óssea (JAMUR, 2005) que podem, também, ser encontrados na mucosa intestinal de camundongos. Mastócitos 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* (EBERSOLE; CAPPELLI, 2000; SUSIN et al. 2004) e adotam um fenótipo determinado pelo microambiente (TAYLOR; METCALFE, 2001).

Os mastócitos humanos variam em forma, têm núcleos arredondados e o citoplasma contêm grânulos ligados à membrana e corpos lipídicos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). O conteúdo granular difere conforme o tipo de mastócito e essa heterogeneidade é atribuída a diferenças de proteases, proteoglicanas, citocinas e fatores de crescimento requeridos para sua diferenciação (RAO; BROWN, 2008).

Em roedores, foram descritos dois subtipos de mastócitos, aqueles do tecido conjuntivo (CTMC), encontrados na pele e na cavidade peritoneal, e os mastócitos da mucosa (MMC) que residem principalmente na mucosa dos pulmões e do trato gastrointestinal. Os MMC possuem em seus grânulos grande quantidade de sulfato de condroitina, pouca histamina e carboxipeptidase, e respondem ao estímulo da IgE, produzindo o leucotrieno C4 (ABBAS; LICHTMAN, 2008; RAO; BROWN, 2008).

Em humanos, existem dois subtipos análogos de mastócitos que diferem no conteúdo de seus grânulos: os mastócitos que contêm triptase e quimase, e aqueles

que possuem somente triptase, que são correlatos dos MMC dos roedores, encontrando-se predominantemente em mucosas (RAO; BROWN, 2008).

Os mastócitos são células residentes do tecido conjuntivo fibroso que participam do sistema imune e são encontradas principalmente nos tecidos subcutâneos e nas mucosas, próximas aos vasos sanguíneos e nervos, sendo as primeiras células a entrar em contato com patógenos invasores.

Os mastócitos apresentam diversos receptores em sua membrana, incluindo aqueles relacionados ao reconhecimento de patógenos ou de seus constituintes, assim como receptores para opsoninas séricas como o FcεR, o FcγR 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 et al., 1997). Além disso, mastócitos expressam TLR1, 2, 3, 4, 6 e 9 (APPLEQUIST et al., 2002; MARSHALL & JAWDAT, 2004). A interação dos mastócitos, 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 e citocinas, dentre elas os IFNs, o TNF-α e as ILs (METCALFE; BARAM; MEKORI, 1997; QU et al., 1998; KODA et al., 2000; STEINSVOLL; HELGELAND; SCHENCK, 2004; ABBAS, et al., 2008).

Estas células liberam uma ampla variedade de mediadores pró-inflamatórios que são responsáveis pela fisiopatologia de muitas doenças alérgicas. Os mastócitos são tão amplamente reconhecidos como células efetoras em doenças alérgicas e outras respostas imunológicas adquiridas associadas à IgE, que pode ser difícil relacioná-los com outras respostas patológicas. No entanto, os mastócitos também podem ser importantes como iniciadores e efetores da imunidade inata. Além disso, mastócitos ativados, durante a resposta imune inata por patógenos, podem secretar produtos com o potencial de facilitar o desenvolvimento, ampliar a magnitude ou regular a cinética da resposta imune adaptativa. Assim, os mastócitos podem influenciar o desenvolvimento, a intensidade e a duração das respostas imunes adaptativas que contribuem para a defesa do hospedeiro, em processos alérgicos e de auto-imunidade (MALAVIYA et al., 1994, 1998 e 2001).

#### 2.5 Mastócitos na Doença Periodontal Inflamatória

Além dos linfócitos, os mastócitos também têm sido observados tanto no periodonto normal quanto inflamado, em diferentes quantidades e em vários locais (CARRANZA; CABRINI, 1955; SHAPIRO; ULMANSKY; SCHEUER, 1969; ROBINSON; DE MARCO, 1972; ASARO et al., 1983; JEFFCOAT et al., 1985; GÜNHAN et al., 1991; WALSH et al., 1995; BATISTA; RODINI; LARA, 2005). Então, uma possível resposta do hospedeiro, que implica na destruição periodontal, pode envolver a participação dos mastócitos (JEFFCOAT et al., 1985). Muitos estudos têm proposto um papel importante dos fatores liberados, por estas células, na destruição tecidual presente na doença periodontal inflamatória (GOLDHABER, 1965; NISENGARD, 1977; NEIDERS et al., 1979; BATISTA; RODINI; LARA, 2005); entretanto, a real contribuição desses fatores durante a progressão da doença periodontal inflamatória permanece desconhecida (JEFFCOAT et al., 1985; STEINSVOLL; HELGELAND; SCHENCK, 2004).

CARRANZA & CABRINI, em 1955, foram os pioneiros a pesquisar a presença de mastócitos em doença periodontal inflamatória humana, observando um grande número de mastócitos tanto em tecido gengival normal quanto em gengivite crônica marginal. SANTOS, em 1961, estudou além da presença de mastócitos nas doenças periodontais inflamatórias humanas, suas características morfológicas peculiares e sua localização, observando um aumento proporcional de mastócitos com o aumento da intensidade do infiltrado inflamatório. Entretanto, SHELTON & HALL, em 1968, encontraram em tecidos periodontais humanos uma diminuição no número de mastócitos na presença de inflamação crônica; porém, quando a resolução do processo inflamatório era mantida, os níveis de mastócitos aumentavam. BARNETT, em 1973 e em 1974, observou a presença de mastócitos no interior do revestimento epitelial de bolsas periodontais, apresentando características morfológicas sugestivas de síntese e liberação do conteúdo de seus grânulos para o espaço extracelular. Este autor relatou ainda uma distribuição difusa de mastócitos por todo o tecido conjuntivo e uma íntima relação destas células com fibras colágenas e células endoteliais, em biópsias humanas de doença periodontal inflamatória. A partir dessas observações, o autor sugeriu a hipótese de que, em lesões gengivais inflamatórias crônicas, o efeito primário dos mastócitos, presentes no interior do epitélio e no tecido conjuntivo, seria de proporcionar o aumento da destruição tecidual, promovendo e/ou acentuando a atividade enzimática.

GÜNHAN et al., em 1991, observaram relação entre o aumento de mastócitos e fibrose do tecido conjuntivo, em amostras gengivais humanas, sugerindo que os constituintes presentes nos grânulos citoplasmáticos destas células têm o potencial de afetar componentes do tecido conjuntivo. Ainda, para alguns autores, o número de mastócitos parece ser inversamente proporcional ao grau de inflamação tecidual, estando essas células presentes em maior quantidade durante o processo de reparo, inclusive para os casos de doença periodontal inflamatória (ZACHRISSON; SCHULZ-HAUDT, 1967; ATKINS et al., 1985; GÜNHAN, et al., 1991). Por outro lado, FRAME & NIXON, em 1968, e JEFFCOAT et al., em 1985, observaram, em humanos e em animais respectivamente, uma correlação positiva entre presença de mastócitos e perda óssea.

BATISTA et al., em 2005, após análise quantitativa de mastócitos por imunohistoquímica, em casos de periodontite crônica localizada, de gengivite associada à
placa dentobacteriana e de tecidos gengivais clinicamente saudáveis, demonstraram
um aumento do número de mastócitos na presença de doença periodontal
inflamatória humana, o que sugere a participação destas células na patogenia da
doença, provavelmente nos mecanismos de defesa e/ou fenômenos destrutivos.
Porém, a real participação dos mastócitos nas doenças periodontais ainda não foi
esclarecida, em especial quanto a sua participação como fagócito.

A abundância particular de mastócitos na pele, nas superfícies das mucosas e nas proximidades de vasos sanguíneos e linfáticos levanta a possibilidade de que os mastócitos possam ser uma das primeiras células inflamatórias encontradas por bactérias invasoras (MALAVIYA, et al., 1994, 1997 e 1998).

#### 2.6 Mastócitos e Fagocitose

Atualmente, existem evidências de que os mastócitos, 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 (MALAVIYA; ABRAHAM, 2001).

MALAVIYA et al., em 1994, relataram que os mastócitos reconhecem e se ligam avidamente a bactérias do tipo *Escherichia coli*, tanto que essas bactérias aderentes foram fagocitadas e mortas, por meio da acidificação do vacúolo fagocitário e da liberação de superóxidos pelos mastócitos. Estes resultados indicam que os mastócitos possuem a capacidade de reconhecer e destruir as bactérias e, portanto, desempenhar um papel potencialmente crucial na defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas. Considerando que a atividade bactericida dos mastócitos envolve espécies reativas do oxigênio e a acidificação do vacúolo fagocitário, estas células compartilham as ações fagocitária e microbicida com os neutrófilos e macrófagos.

Muitos autores indicaram que bactérias vivas ou mortas e seus antígenos ativam a desgranulação de mastócitos, com a liberação simultânea de mediadores pré-formados e citocinas contidas nos grânulos. Estudos em animais demonstraram que os mastócitos peritoneais desgranulam e liberam histamina em resposta à estimulação por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli in vitro* (WIERZBICKI; BRZEZIŃSKA-BŁASZCZYK, 2009).

KÖCKRITZ-BLICKWEDE et al., em 2008, foram os primeiros a fornecer evidências científicas de que os mastócitos podem eliminar bactérias através de mecanismos independentes da fagocitose. O grupo mostrou que os mastócitos são componentes essenciais na defesa do hospedeiro contra patógenos, aprisionando-as em estruturas extracelulares compostas de DNA, histonas, triptase e do peptídeo antimicrobiano LL-37. Tais componentes foram previamente observados em neutrófilos (NETs - Neutrophil extracellular traps), sugerindo a denominação, nos mastócitos, de MCETs (Mast Cells Extracellular Traps).

Embora existam trabalhos demonstrando a capacidade fagocítica e microbicida dos mastócitos frente a bactérias gram-negativas, nada se tem sobre a participação dos mastócitos na eliminação de periodontopatógenos via fagocitose.

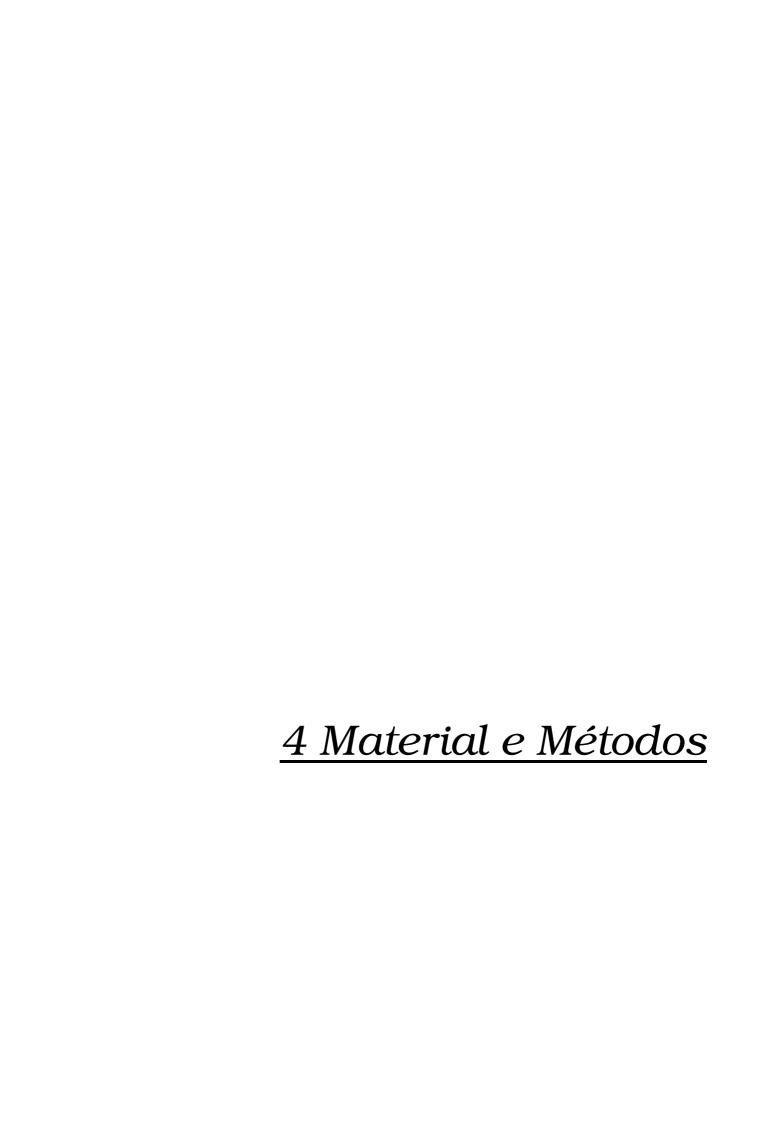
Uma vez que *A. actinomycetemcomitans* é uma das bactérias amplamente relacionadas à doença periodontal inflamatória e que o seu componente LPS participa da ativação de células inflamatórias, torna-se importante um maior conhecimento da relação mastócito/*A. actinomycetemcomitans*, em especial as capacidades fagocítica e microbicida, bem como imunomodulatória, destas células frente a esta bactéria, caracterizando aspectos da participação dos mastócitos na resposta imune e na eliminação dos periodontopatógenos nas DPs inflamatórias.

3 Proposição

# 3 PROPOSIÇÃO

Considerando os aspectos abordados, no presente trabalho, pretendemos:

- ✓ Investigar *in vitro* a capacidade fagocítica de mastócitos murinos frente ao desafio com o periodontopatógeno *A. actinomycetemcomitans* e
- ✓ Comparar com a capacidade fagocítica dos macrófagos peritoneais murinos, considerados fagócitos profissionais.



## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

#### 4.1 Animais de experimentação

A cultura primária de mastócitos foi derivada da medula óssea femoral de camundongos (*Mus musculus*) C57BL/6 (WT), machos jovens de 4 a 6 semanas. Tais animais foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (FOB-USP), e 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 e os animais alojados no Biotério Central, de acordo com as normas e condições adotadas pela Instituição. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo referido Comitê (CEEPA-Proc. nº 028/2010).

### 4.2 Isolamento, diferenciação e expansão dos mastócitos

Para a obtenção dos mastócitos derivados da medula óssea (bone marrow-derived mast cells - BMMC) os animais foram sacrificados por meio de dose excessiva de anestésico (0,1 mL de Cloridrato de Ketamina - Dopalen®) em associação com relaxante muscular (0,1 mL de Cloridrato de Xilazina - Anasedan®); em seguida, os fêmures foram dissecados e acondicionados em microtubos contendo meio de transporte RPMI 1640 simples (GIBCO®, Invitrogen™, ref. 22400-089, Grand Island, New York, USA). Para manutenção das condições estéreis, o experimento seguiu-se em cabine de fluxo laminar. A medula óssea foi removida dos fêmures por meio de lavagens da cavidade medular com meio RPMI 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 36 μM de Bicarbonato de Sódio (Merck®, Rio de Janeiro, BR), com auxílio de uma seringa de 10 mL. A medula óssea foi dissociada por sucessivas aspirações com pipeta *Pasteur*. A suspensão celular obtida da medula óssea foi centrifugada duas vezes em RPMI completo, a 400 xg por 10

minutos e, ao final, o pellet celular foi ressuspenso em 1 mL de RPMI completo. As células foram contadas e avaliadas quanto a sua viabilidade através de azul de Trypan em câmara de Neubauer. Em seguida, 0,5 x 10<sup>6</sup> células medulares por mL de RPMI completo foram plaqueadas em garrafas de 25 cm² (TPP® - Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland). Para a diferenciação e expansão celular, foram adicionados 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 CO<sub>2</sub>

#### 4.3 Caracterização morfológica e imunofenotipagem de BMMC

Após três semanas, o sobrenadante (suspensão celular) da cultura foi coletado e centrifugado duas vezes, sendo a primeira lavagem realizada com RPMI completo, e a segunda com PBS, ambas a 218 xg a 24°C por 5 minutos; ao final, o pellet celular foi ressuspenso em 1 mL de PBS. As células foram contadas através da câmara de Neubauer, utilizando-se azul de toluidina, sendo então ajustadas a uma concentração de 2 x 10<sup>6</sup> células/mL. Ainda, as células coradas pelo azul de toluidina, eram avaliadas quanto aos seus aspectos morfológicos, revelando sua viabilidade e diferenciação para mastócitos, por meio da coloração positiva dos seus grânulos citoplasmáticos.

Para a imunofenotipagem, 1 mL de PBS foi adicionado a suspensão celular contendo os mastócitos murinos (ajustada previamente a concentração de 2 x 10<sup>6</sup> células/mL), obtidos de uma única garrafa de cultura. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 218 xg a 24°C por 5 minutos e ressuspendida 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 218 xg a 24°C por 5 minutos. Na sequência, o precipitado celular foi ressuspenso em 2 mL de PBS contendo 2% de BSA (INLAB®, São Paulo, BR) por 45 minutos, sob leve agitação para minimizar as ligações inespecíficas. Em seguida, a suspensão celular foi acondicionada em diferentes tubos de poliestireno (500 μL por tubo) para incubação dos anticorpos monoclonais (mAb) contra moléculas específicas de superfície de mastócitos murinos. 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) gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto FMRP-USP) e anti-AA4 (gangliosídeos derivados do GD1b, presentes apenas na membrana de mastócitos) conjugado a fluoresceína isoticianato (FITC) gentilmente cedido pela Profa. Dra. Maria Célia Jamur, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Mastócitos, do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Perto FMRP-USP). 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 218 xg, a 4°C, por 10 minutos e ressuspensas em 300 µL de PBS contendo 2% de paraformaldeído (2%) para fixação das células. As preparações celulares (10.000 células por tubo) foram adquiridas em citômetro de fluxo FACSCalibur<sup>TM</sup> (Becton & Dickinson<sup>®</sup>, San Diego, CA, USA) 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 Cultura de Aggregatibacter actinomycetemcomitans e Escherichia coli

Estudos prévios conduzidos por MALAVIYA et al., em 1994, reportaram que diferentes cepas de bactérias entre elas *Eschirichia coli* (*E. coli*) ligaram-se avidamente em mastócitos de camundongos. Esta interação bactéria/mastócito desencadeou a fagocitose e morte bacteriana por este tipo celular. Sendo assim, para se assegurar inicialmente que as células BMMC, obtidas em nosso laboratório, eram capazes de fagocitar, foi realizado concomitantemente o ensaio de fagocitose de *E. coli* pelos BMCC, o qual representou um experimento padrão.

As cepas de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523 e de *Escherichia 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. As cepas de A. actinomycetemcomitans foram inicialmente cultivadas em placas de cultura (Petri) contendo meio TSA (Tryptic Soy Agar, DIFCOTM, Becton Dickson Company, San Jose, EUA) acrescido de 0,6% de extrato de levedura (DIFCOTM, Becton Dickson Company, San Jose, EUA). As placas foram mantidas em ambiente de microaerofilia com aproximadamente 5 - 10% de CO2, em estufa a 37°C por 5 dias. Já as cepas E. coli foram inicialmente cultivadas em placas de cultura (Petri) contendo meio BHI (Brain Heart Infusion Agar, Acumedia, Neogen Corporation, Michigan, EUA), as quais foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. 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 (Ultraspec 1000, Pharmacia Biotech, Westerville, EUA) de onda de 660λ. Para com comprimento а cepa de Α. actinomycetemcomitans, a suspensão bacteriana foi padronizada na concentração de 1x10<sup>9</sup> UFC/ml e para a cepa de *E. coli* na concentração de 1x10<sup>7</sup> UFC/ml.

#### 4.5 Ensaio de fagocitose:

#### BMMC versus A. actinomycetemcomitans e BMMC versus E. coli

Após três semanas para obtenção das células diferenciadas, o sobrenadante (suspensão celular) da cultura foi coletado e centrifugado duas vezes com meio RPMI contendo 10% de SFB ausente de antibiótico, a 218 xg por 5 minutos a 24°C; ao final, o pellet celular foi ressuspenso em 1mL de RPMI contendo SFB. As células foram contadas através da câmara de Neubauer, utilizando-se azul de toluidina, e a suspensão celular foi ajustada a concentração de 5 x 10<sup>5</sup> mastócitos por mL (RPMI contendo SFB). Neste momento, as células eram também avaliadas quanto aos seus aspectos morfológicos, revelando sua viabilidade e diferenciação para mastócitos.

Para a análise da atividade fagocítica *in vitro*, as bactérias eram ou não previamente opsonizadas via complemento através de um pool de soro humano, por 20 minutos, sob leve agitação (75 rpm) a 37°C (50 μ L de pool de soro humano em 1mL da suspensão de bactérias). Os mastócitos murinos recém-diferenciados (5 x

10<sup>5</sup> células/mL) foram acomodados em microtubos, Α. ora com actinomycetemcomitans ora com E. coli, opsonizados ou não, para o ensaio de fagocitose. Tais desafios ocorreram sob diferentes proporções: 1 mastócito para 5 A. actinomycetemcomitans (1:5), 1:10 e 1:25; e 1 mastócito para 10 E. coli (1:10), por 1 hora, a 37°C, sob leve agitação. Após este período, as suspensões celulares foram centrifugadas a 218 xg por 10 minutos a 24°C e o precipitado ressuspenso em 200 µL de meio RPMI 1640 simples. As suspensões celulares foram transferidas para placas de cultura de 24 poços, contendo, no fundo de cada poço, uma lamínula de vidro esférica com diâmetro de 13 mm, estéril e previamente tratadas com Biobond® (Electron Microscopy Sciences), para a aderência das células. Após alguns minutos, os poços foram lavados com PBS para remoção de possíveis bactérias extracelulares. As lamínulas com as células aderidas foram devidamente fixadas com paraformaldeído (PFA) a 2% em PBS por 20 minutos e lavadas novamente com PBS. Em seguida, as mesmas foram coradas com laranja de acridina (Merck®, Alemanha), a uma concentração de 0,05 mg/mL, por 15 minutos sob proteção da luz. Após, os poços foram lavados duas vezes com PBS gelado, para remover o excesso de corante, e as lamínulas foram retiradas cuidadosamente do fundo dos pocos e montadas com resina Permount® (Fisher Scientific, New Jersey, USA) sobre lâminas de vidro para microscopia. Sequencialmente, as lâminas foram avaliadas qualitativamente, utilizando-se microscópio de varredura confocal a laser (Leica TCS-SPE®, Mannheim, Alemanha), diferenciando as bactérias fagocitadas das bactérias somente ligadas a moléculas de superfície dos mastócitos. A análise quantitativa foi realizada através do microscópio de fluorescência Axiostar HBO plus 50/AC (Carl Zeiss, Alemanha), em objetiva de 100x, contando-se os mastócitos com bactérias internalizadas ou não, a partir de 20 campos aleatórios capturados por meio do programa AxioVision Rel. 4.6 (Carl Zeiss, Alemanha). A internalização bacteriana foi avaliada considerando o número de bactérias internalizadas por célula (≤5 e >5). Os resultados foram obtidos a partir da média dos três experimentos independentes, considerando o total de células contadas por lamínula (20 campos) em cada experimento.

Paralelamente aos ensaios fagocíticos com mastócitos, foram realizados os mesmos ensaios utilizando-se macrófagos peritoneais murinos, uma vez que estas são consideradas células classicamente fagócitos profissionais (ABBAS: LICHTMAN; PILLAI, 2008), inclusive em relação as bactérias *E. coli* (PEISER, et al., 2000; SEWNATH, et al., 2001; PINHEIRO DA SILVA, et al., 2007; QIANG, et al., 2010;) e A. actinomycetemcomitans (GELANI, et al., 2009). Assim, a partir da fagocitose macrofágica, foi possível averiguar se as bactérias eram passíveis ou não de ser fagocitadas, nas condições utilizadas no nosso laboratório; obtendo-se então um experimento padrão adicional. Além disso, foi possível comparar a capacidade fagocítica apresentada por ambos os tipos celulares, mastócitos e macrófagos, estes últimos considerados fagócitos profissionais.

#### 4.6 Obtenção e cultura dos macrófagos murinos

Para aquisição de macrófagos residentes da cavidade peritoneal, os animais foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). 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 8 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 ressuspendido em 1 mL de RPMI completo (meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 5% 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 azul de Trypan, obtendo-se um mínimo de 95% de células vivas. Novamente, as células foram contadas utilizando-se Vermelho Neutro para ajustar a concentração desejada de macrófagos (5 x 10<sup>5</sup> células/ml).

### 4.7 Ensaio de fagocitose

### Macrófagos versus A. actinomycetemcomitans e macrófagos versus E. coli

Para o ensaio de fagocitose macrofágica, sequencialmente, 1 mL de macrófagos murinos (5 x 10<sup>5</sup> células/ml) foram distribuídos em cada poço de uma placa de 24 poços, sendo que no fundo de cada poço havia uma lamínula circular estéril de 13 mm . A placa foi incubada por 2 horas a 37℃ a uma atmosfera de 5% de CO₂. Após esse tempo, as células não aderidas foram retiradas, por meio de lavagem com PBS morno e acrescentou-se 1 mL de meio de cultura (RPMI 1640 completo) em cada poço. A placa de cultura era mantida *overnight*, em estufa a 37°C sob atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

Na sequência, retiraram-se os sobrenadantes dos poços, e esses foram lavados duas vezes com PBS morno e foi adicionado, em cada um deles, 1 mL de meio RPMI simples contendo 5% de SFB, porém ausente de antibiótico, e mais 1 mL de bactérias *A. actinomycetemcomitans* ou *E. coli*, opsonizadas ou não. A opsonização e as proporções célula:bactéria (s) foram realizadas como descrito previamente (item 4.5). O desafio foi realizado em 1 hora, na estufa de 5% de CO₂ a 37℃.

Após o desafio, removeram-se os sobrenadantes dos poços e estes foram armazenados a -80℃ para futuras análises. Os poços foram lavados duas vezes com PBS, e as lamínulas fixadas com PFA a 2%, por 20 minutos, e lavadas novamente com PBS. Os passos que abordam a coloração até as análises qualitativa e quantitativa foram os mesmos descritos no item 4.5.

#### 4.8 Análise estatística

Os resultados quantitativos foram expressos como média ± desvio padrão (SD) dos valores obtidos de cada variável estudada. A análise estatística foi realizada por meio do teste *Two-way* ANOVA, seguido do teste de Tukey e teste *t* student. Valores de *P*<0,05 foram considerados como indicativos de significância estatística.

5 Resultados

#### **5 RESULTADOS**

#### 5.1 Caracterização morfológica e imunofenotipagem de BMMC

Após 21 dias de cultura, os mastócitos murinos recém-diferenciados foram submetidos à caracterização morfológica e imunofenotípica, através da coloração com azul de toluidina e citometria de fluxo, respectivamente. As fotomicrografias apresentadas nas Figuras 1A a 1D, após coloração com azul de toluidina, demonstram a presença de inúmeros mastócitos maduros (bem diferenciados) providos de citoplasma repleto de grânulos metacromáticos. Raras células estavam ausentes de grânulos corados, sugerindo tratar-se de mastócitos 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 ou perifericamente 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 mastócitos murinos e analisadas por citometria de fluxo. Das células com tamanho e granularidade compatíveis com mastócitos, 99% eram CD117<sup>+</sup>/FcɛRI<sup>+</sup> (Figura 1E). Esta dupla marcação confirmou a obtenção de uma cultura pura de mastócitos diferenciados. Observou-se ainda uma frequente expressão (98%) de AA4 (Figura 1F), confirmando mais uma vez a homogeneidade da cultura celular de mastócitos.

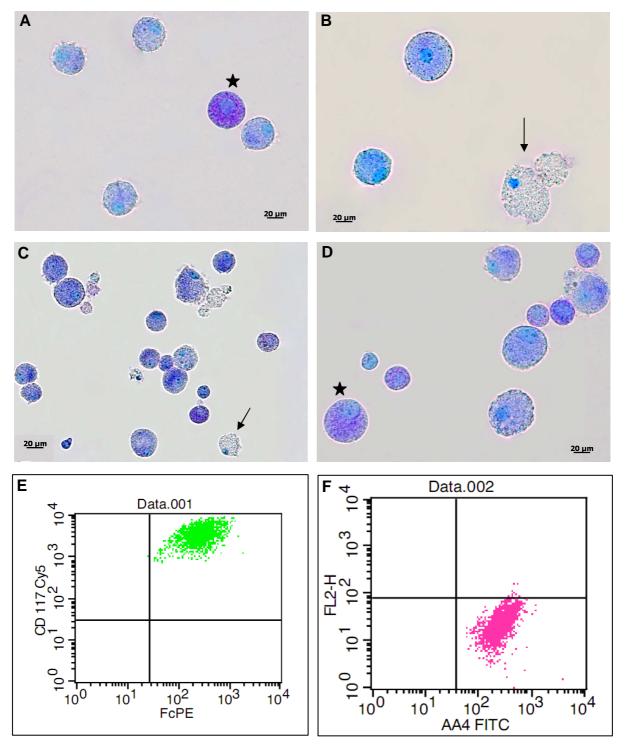


Figura 1 Caracterização morfológica e imunofenotipagem dos mastócitos murinos. Após três semanas de diferenciação celular, os BMMC foram corados com azul de toluidina (A a D) apresentando citoplasma ora repleto de grânulos metacromáticos (\*), ora ausentes (setas). (E) e (F) Imunofenotipagem através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

#### 5.2 Capacidade fagocítica in vitro de BMMC versus A. actinomycetemcomitans.

**Após** 1 de desafio periodontopatógeno hora com Α. actinomycetemcomitans, considerando as bactérias opsonizadas com complemento, nas proporções 1:5 e 1:10 (BMMC:bactéria), houve um maior percentual, porém sem diferença estatisticamente significativa, de BMMC com bactérias internalizadas (51 ± 5,31% e 51 ± 6,16%, respectivamente) comparados aos BMMC ausentes de bactéria  $(49 \pm 5,31\% \text{ e } 49 \pm 6,16\%, \text{ respectivamente})$ . Dos 51% (média) de BMMC que apresentavam A. actinomycetemcomitans em seu interior em ambas as proporções citadas acima, apenas 21 ± 3,5% e 11 ± 5,18% (respectivamente) deles possuíam mais que cinco bactérias internalizadas. Já na proporção 1:25, os BMMC apresentaram valores percentuais estatisticamente maiores de células com presença de A. actinomycetemcomitans no citoplasma (63 ± 6,12%) em comparação às células ausentes de bactérias (37 ± 6,12%) (P=0,011). Dentre as células com presença de bactérias, 44 ± 5,43% possuíam mais que cinco bactérias no seu interior (Gráfico 1 e Apêndice 1).

Avaliando as bactérias não opsonizadas, foi observada uma maior internalização bacteriana (ou seja, do valor percentual de células com bactérias internalizadas) dos mastócitos, nas proporções 1:5 e 1:10, em comparação às bactérias opsonizadas (P=0,02 e P=0,004, respectivamente) (Gráfico 1).

Os altos índices de fagocitose sem opsonização, nas diferentes proporções  $(1:5-67\pm3,68\%,\ 1:10-80\pm3,26\%\ e\ 1:25-74\pm4,1\%)$ , diferem estatisticamente dos valores percentuais dos BMMC ausentes de bactérias, avaliando cada proporção individualmente (P=<0,001, para todas as proporções) (Gráfico 1).

Além disso, constatou-se também que o percentual de BMMC com mais de cinco bactérias internalizadas não opsonizadas, na proporção 1:10 (48  $\pm$  2,86%), foi maior quando comparado aos BMMC com mais de cinco bactérias internalizadas opsonizadas (11  $\pm$  5,18%) (P= 0,0008) (Apêndice 1).

Estes resultados revelaram que a internalização de *A. actinomycetemcomitans* pelos mastócitos, após 1 hora, apresentou-se maior na ausência de opsonização, em comparação às bactérias opsonizadas.

### Fagocitose de A. actinomycetemcomitans por Mastócitos

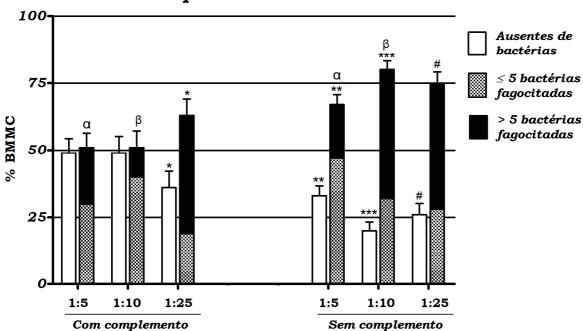


Gráfico 1 - Porcentagem de BMMC com *A. actinomycetemcomitans* internalizados ou não. Os BMMC foram classificados da seguinte forma: ausentes de bactérias (colunas brancas), ou apresentando até cinco (colunas cinzas) ou mais (colunas pretas) bactérias internalizadas, após 1 hora de desafio *in vitro* com diferentes proporções de célula por bactérias: 1:5, 1:10 e 1:25, a partir de três experimentos independentes. O gráfico demonstra o desvio padrão do percentual de células que não fagocitaram, e de células que fagocitaram. Os dados foram analisados pelo teste de Tukey e teste t student. Símbolos iguais representam diferenças estatísticas,  $\alpha$ , \*P<0,05;  $\alpha$ 0,01; \*\*, \*\*\*,  $\alpha$ 0,001.

# 5.3 Capacidade fagocítica *in vitro* de macrófagos peritoneais murinos *versus A. actinomycetemcomitans*.

Em todas as proporções macrófago:bactérias opsonizadas, os macrófagos demonstraram valores percentuais maiores de internalização de A. actinomycetemcomitans (1:5 - 62 ± 4,78%, 1:10 - 58 ± 0% e 1:25 - 68 ± 10,27%) que aqueles referentes às células ausentes de bactérias, nas diferentes proporções avaliadas separadamente (1:5 - P=0,008, 1:10 - P=0,001 e 1:25 - P=0,023), sugerindo então a contribuição desta opsonina na internalização deste agente agressor pelos macrófagos (Gráfico 2).

Na ausência desta opsonina, verificaram-se, nas proporções 1:5 e 1:25, percentuais semelhantes de células com bactérias internalizadas ( $43 \pm 5,71\%$  e  $41 \pm 10,07\%$ , respectivamente), em relação aos macrófagos ausentes de bactérias ( $57 \pm 5,71\%$  e  $59 \pm 10,07\%$ , respectivamente). Porém, na proporção 1:10, houve maior percentual de células ausentes de bactérias internalizadas ( $58 \pm 5,90\%$ ) do que de células com bactérias internalizadas ( $42 \pm 5,90\%$ ) (P=0,048) (Gráfico 2).

Além disso, observou-se uma diferença estatisticamente significante (P=0,007), na proporção 1:25, entre os macrófagos que apresentaram mais que cinco bactérias, comparando-se presença  $(35 \pm 9,84\%)$  ou não  $(13 \pm 3,09\%)$  de opsonização (Apêndice 2). Notou-se, ainda, que a porcentagem média de macrófagos com mais de cinco bactérias internalizadas não atingiu mais que 35%, em todas as variáveis analisadas. Sendo assim, dentre os macrófagos que continham, em seu interior, A. actinomycetemcomitans, opsonizados ou não, a maioria deles apresentava até cinco bactérias internalizadas, diferentemente dos mastócitos (Gráfico 2 e Apêndice 2).

Os dados revelaram ainda, de forma inversa aos mastócitos, que a capacidade fagocítica dos macrófagos frente a *A. actinomycetemcomitans*, por 1 hora, foi melhor na presença de opsonização com complemento, em relação à fagocitose das bactérias não opsonizadas, nas proporções 1:5 e 1:10 (*P*=0,02, para ambas) (Gráfico 2).

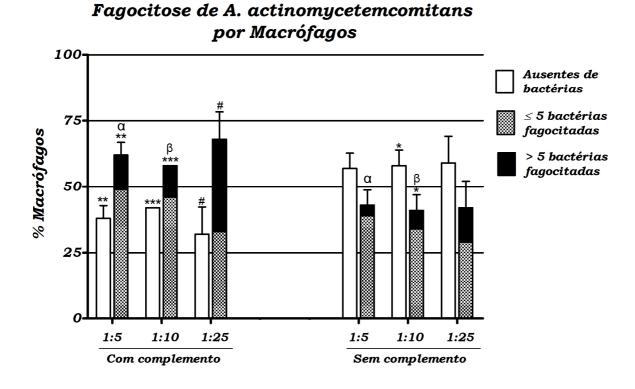


Gráfico 2 - Porcentagem de Macrófagos peritoneais murinos com *A. actinomycetemcomitans* internalizados ou não. Os macrófagos foram classificados da seguinte forma: ausentes de bactérias (colunas brancas), ou apresentando até cinco (colunas cinzas) ou mais (colunas pretas) bactérias internalizadas, após 1 hora de desafio *in vitro* com diferentes proporções de célula por bactérias: 1:5, 1:10 e 1:25, a partir de três experimentos independentes. O gráfico demonstra o desvio padrão do percentual de células que não fagocitaram, e de células que fagocitaram. Os dados foram analisados pelo teste de Tukey e teste t student. Símbolos iguais representam diferenças estatísticas,  $^{\#}$ ,  $^{\alpha}$ ,  $^{\beta}$ ,  $^{*}$  P < 0.05;  $^{**}P < 0.01$ ;  $^{***}$ ,  $^{**}$  P < 0.001.

# 5.4 Análise comparativa da capacidade fagocítica *in vitro* de BMMC e de macrófagos peritoneais murinos, frente a *A. actinomycetemcomitans*.

Comparando-se a atividade fagocítica dos dois tipos celulares, em relação às bactérias opsonizadas, observou-se, na proporção 1:5, um maior percentual de macrófagos com até cinco bactérias internalizadas (49  $\pm$  5,71%), em comparação aos mastócitos (30  $\pm$  5,90%) (P=0,03). Interessantemente, o inverso foi observado na análise quantitativa das células com mais que cinco bactérias internalizadas, na

mesma proporção, ou seja, 21  $\pm$  3,55% para mastócitos e 13  $\pm$  2,05% para macrófagos (P=0,04) (Gráfico 3A e Apêndices 1 e 2).

Na proporção 1:10, a capacidade fagocítica foi semelhante comparando os dois tipos celulares, embora os valores percentuais de macrófagos com A. actinomycetemcomitans internalizadas tenham sido ligeiramente maiores (até cinco bactérias -  $46 \pm 2,35\%$ ; com mais de cinco -  $12 \pm 2,35\%$ ) que aqueles dos mastócitos  $(40 \pm 3,68\% \text{ e } 11 \pm 5,18\%, \text{ respectivamente})$ .

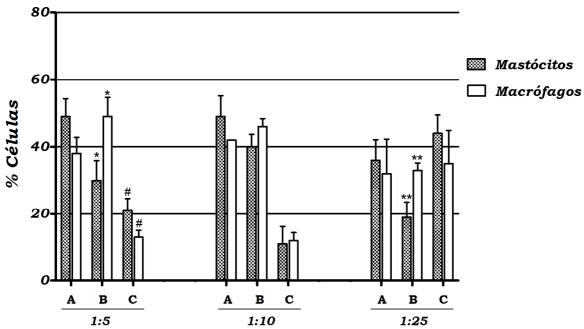
De forma semelhante à proporção 1:5, os resultados, na proporção 1:25, demonstraram valores percentuais maiores de macrófagos com até cinco bactérias internalizadas (33  $\pm$  2,16%), em comparação aos mastócitos com até cinco bactérias internalizadas (19  $\pm$  4,49%) (P=0,02) (Gráfico 3A e Apêndices 1 e 2).

Interessantemente, para as bactérias não opsonizadas, percentuais mais elevados de macrófagos ausentes de bactérias foram observados, nas três diferentes proporções (1:5 - 57  $\pm$  5,71%, 1:10 - 58  $\pm$  5,90% e 1:25 - 59  $\pm$  10,07%), em relação aos mastócitos ausentes de bactérias (33  $\pm$  3,68%, 20  $\pm$  3,26% e 26  $\pm$  4,11%, respectivamente) (P=0,007, P=0,001 e P=0,01, respectivamente).

Além disso, em todas as proporções utilizadas, o percentual de mastócitos com mais de cinco bactérias internalizadas ( $20 \pm 5,79\%$ ,  $48 \pm 2,86\%$  e  $47 \pm 5,43\%$ , respectivamente) foi maior comparado aos macrófagos com mais de cinco bactérias internalizadas ( $4 \pm 2,16\%$ ,  $8 \pm 3,09\%$  e  $13 \pm 3,09\%$ , respectivamente) (P=0,02, P=0,0002, P=0,001, respectivamente) (Gráfico 3B e Apêndices 1 e 2).

Estes dados indicam que, na ausência de opsonização, mais mastócitos com *A. actinomycetemcomitans* internalizados foi observado do que macrófagos, após 1 hora, principalmente com mais que cinco bactérias; isto pode sugerir uma maior capacidade fagocítica dos mastócitos em relação aos macrófagos, frente ao periodontopatógeno não opsonizado.

## A Fagocitose de A. actinomycetemcomitans com opsonização



## B Fagocitose de A.actinomycetemcomitans sem opsonização

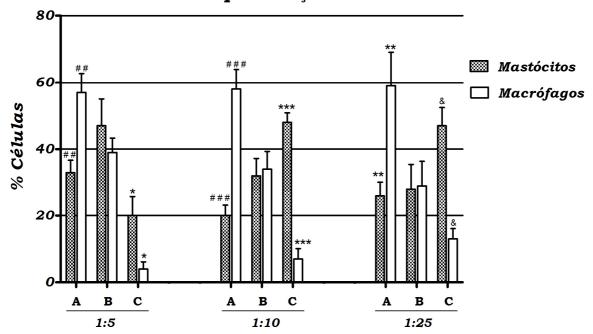


Gráfico 3 - Comparação da capacidade fagocítica contra *A. actinomycetemcomitans*, opsonizados ou não, entre os dois tipos celulares. Os mastócitos (colunas cinzas) e macrófagos (colunas brancas) foram classificados da seguinte forma: ausentes de bactérias (A), ou apresentando até cinco (B) ou mais que cinco bactérias internalizadas (C), após 1 hora de desafio *in vitro* com diferentes proporções de célula por bactérias: 1:5, 1:10 e 1:25, a partir de três experimentos independentes. Os dados foram analisados pelo teste de Tukey e teste *t student* e símbolos iguais representam diferenças estatísticas, \*, \*, \*\*\* P< 0,05; \*##, \*###, \* P< 0,01; \*\*\*\*, P< 0,001.

Comparando-se os valores percentuais de células com *A. actinomycetemcomitans* internalizados, foi possível observar ainda que, em uma das proporções (1:10), os valores foram maiores para os mastócitos (sem opsonização) em relação aos macrófagos (com opsonização) (*P*=0,0008), sugerindo que os mastócitos com bactérias internalizadas, frente a *A. actinomycetemcomitans* não opsonizados, apresentaram-se mais numerosos do que os macrófagos na sua melhor condição, ou seja, frente a bactéria opsonizada com complemento (Gráfico 4).

### Maior internalização de A. actinomycetemcomitans apresentada pelas células

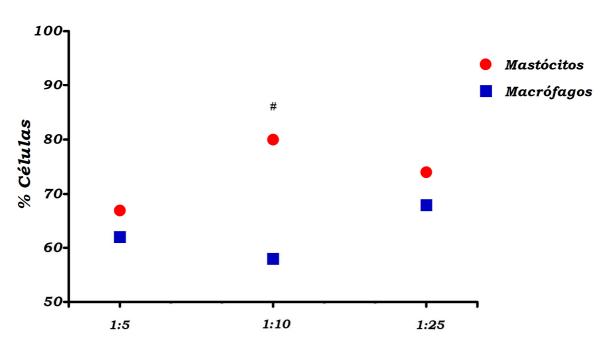


Gráfico 4 - Maior internalização de *A. actinomycetemcomitans*, após desafio por 1 hora, apresentada por cada tipo celular. Neste gráfico, estão representadas as médias mais elevadas dos valores percentuais de mastócitos (círculos vermelhos) e de macrófagos (quadrados azuis) com *A. actinomycetemcomitans* internalizados, após 1 hora de desafio *in vitro* com diferentes proporções de célula por bactérias: 1:5, 1:10 e 1:25. Tais médias mais elevadas foram obtidas, no caso dos mastócitos, na ausência de opsonização, e, no caso dos macrófagos, na presença de opsonização. Os dados foram analisados pelo teste de Tukey. \*\* *P* < 0,05.

# 5.5 Análise comparativa da capacidade fagocítica *in vitro* de BMMC e de macrófagos peritoneais murinos, frente a *E. coli*.

Visto que estudos comprovaram a eficiência dos mastócitos como fagócitos contra *E. coli* (MALAVIYA, et al., 1994, 1996), e para constatar que as células BMMC, obtidas em nosso laboratório, eram capazes de fagocitar, foi realizado o ensaio de fagocitose de BMMC *versus E. coli*, o qual representou um experimento padrão. Paralelamente, foram realizados os mesmos ensaios utilizando-se macrófagos peritoneais murinos, para averiguar, a partir da fagocitose macrofágica, se as bactérias eram passíveis ou não de ser fagocitadas, nas condições utilizadas no nosso laboratório; obtendo-se então um experimento padrão adicional. Além disso, foi possível comparar a capacidade fagocítica apresentada por ambos os tipos celulares (item 5.4), mastócitos e macrófagos, estes últimos considerados fagócitos profissionais.

Os experimentos para avaliação da internalização de *E. coli* foram realizados nas mesmas condições que *A. actinomycetemcomitans*; porém vale ressaltar que para o microrganismo *E. coli*, houve apenas uma única proporção célula:bactéria, ou seja, 1:10.

Comparando-se a atividade fagocítica dos dois tipos celulares desafiados com  $E.\ coli$ , verificou-se, em relação às bactérias opsonizadas, que os macrófagos apresentaram maior capacidade fagocítica (78%  $\pm$  3,39) comparados aos BMMC (50%  $\pm$  2,05) (Apêndice 3). Assim, o percentual de células ausentes de bactérias internalizadas foi estatisticamente maior entre os BMMC (50%  $\pm$  2,05) comparados aos macrófagos (22%  $\pm$  3,39) (P=0,0005). Além disso, o percentual de macrófagos com mais de cinco bactérias internalizadas (38  $\pm$  4,96%) foi estatisticamente maior (P=0,04) em comparação aos BMMC (19  $\pm$  7,76%) (Gráfico 5 e Apêndice 3).

Na ausência de opsonização, o inverso foi observado, ou seja, um maior percentual de mastócitos com mais de cinco bactérias internalizadas ( $29 \pm 3,26\%$ ) em relação aos macrófagos ( $14 \pm 3,29\%$ ) foi verificado (P=0,008) (Gráfico 5 e Apêndice 3).

Os percentuais de células com até cinco bactérias internalizadas não diferiram estatisticamente comparando-se macrófagos e BMMC, independente da opsonização (Gráfico 5 e Apêndice 3).

Assim como nos ensaios fagocíticos com A. actinomycetemcomitans, na presença de opsonização, os mastócitos ausentes de E. coli, em seu interior, foram mais numerosos, em comparação àqueles desafiados com bactérias não opsonizadas (P=0,005); enquanto que macrófagos ausentes de E. coli, após 1 hora, foi mais evidente na ausência de opsonização com complemento, em comparação às bactérias opsonizadas (P=0,005), na proporção 1:10 (Gráfico 5 e Apêndice 3).

As fotomicrografias dos mastócitos com os diferentes tipos de bactérias internalizadas estão demonstradas na Figura 2.

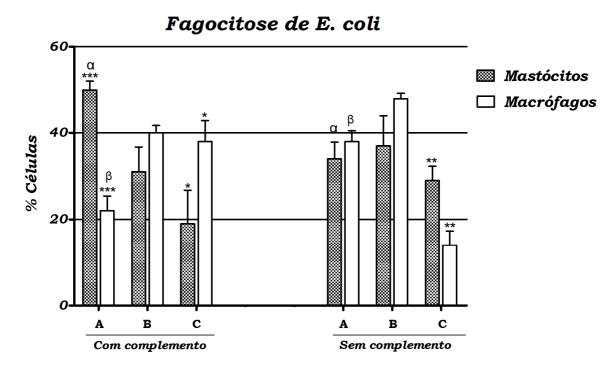


Gráfico 5- Análise fagocítica dos diferentes tipos celulares frente a *E. coli*. Após desafio por 1 hora, macrófagos (coluna branca) e mastócitos (coluna cinza) foram classificados da seguinte forma: ausentes de bactérias (A) até cinco bactérias fagocitadas (B) e mais que cinco bactérias fagocitadas (C), apenas na proporção de 1 célula para 10 bactérias (1:10). O resultado apresentado é a média percentual de três experimentos realizados independentes. Os dados foram analisados pelo teste de Tukey e teste t student. Símbolos iguais representam diferenças estatísticas, \*P<0,05;  $\alpha$ ,  $\beta$ , \*\*P<0,01; \*\*\*\*, P<0,001.

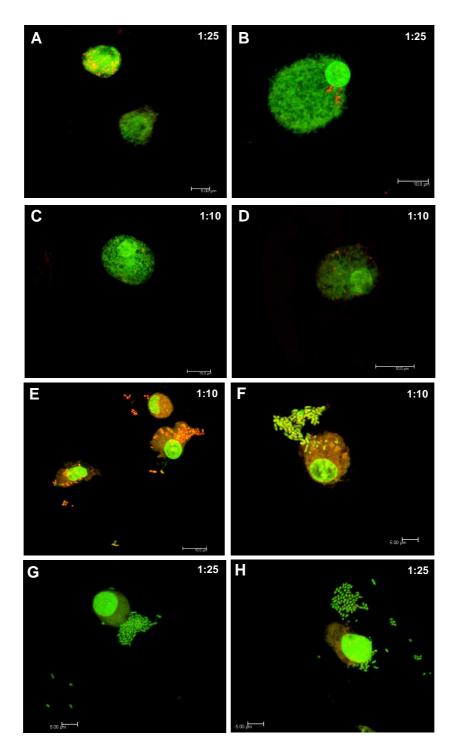


Figura 2- Fagocitose de mastócitos frente a *A. actinomycetemcomitans* e *E. coli*. Após ensaio de fagocitose, as lamínulas com as células aderidas foram lavadas, fixadas e coradas com laranja de acridina. Notam-se, nas Figuras de 2A a 2D, mastócitos corados em verde, apresentando em seu interior o *A. actinomycetemcomitans* ora em vermelho ora em verde. Nas Figuras 2E a 2H, observam-se mastócitos com *E. coli*, ora em verde ora em vermelha, internalizadas ou somente aderidas em sua superfície (microscopia confocal de varredura a laser).

6 Discussão

### 6 DISCUSSÃO

A fagocitose é geralmente definida como a internalização de partículas com diâmetro de pelo menos 0,5 μm, tais como bactérias, parasitas, imunocomplexos grandes, células apoptóticas e debris celulares. Já a ingestão de pequenas partículas, como imunocomplexos pequenos ou outras macromoléculas, ocorre através de um mecanismo chamado endocitose (GREENBERG; SILVERSTEIN, 1993, HAZENBOS; BROWN, 2006). Fagocitose e endocitose são distintas, já que a fagocitose requer a polimerização da actina para promover a motilidade da membrana e a formação de pseudópodes; o mesmo não ocorre na endocitose (SILVERSTEIN, et al., 1977; BOOTH, et al., 2002; HAZENBOS; BROWN, 2006).

Segundo HAZENBOS & BROWN, em 2006, neutrófilos, macrófagos, células mastócitos são considerados fagócitos profissionais dendríticas e apresentarem, na membrana, receptores específicos para o componente C3b do complemento e para a porção Fc das imunoglobulinas, os quais capacitam estas células a reconhecer facilmente partículas com C3b e/ou imunoglobulinas aderidos na superfície. Após o acoplamento destes aos receptores específicos de membrana, inicia a fase de ingestão. Este fenômeno, opsonização, praticamente elimina a fase reconhecimento, abreviando a fagocitose, otimizando e facilitando-a (CONSOLARO, 2009). Os fatores que promovem este fenômeno são reconhecidos como opsoninas, tipicamente o C3b, as imunoglobulinas e as lectinas (BROWN, 1991; BROWN; GORDON, 2001; BROWN, 2005; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Porém, o reconhecimento dos patógenos para o processo fagocítico também está relacionado com receptores de reconhecimento padrão (RRPs), incluindo lectinas tipo C, receptores de varredura (scavenger) e receptores tipo Toll (TLR), presentes na superfície, em vesículas endossômicas e no citoplasma de vários tipos celulares. Os RRPs estão prontos para reconhecer microrganismos que expressam padrões moleculares particulares, como manose, participando então da resposta imune inata (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Os fagócitos da imunidade inata, principalmente neutrófilos, monócitos e seus descendentes, macrófagos, são células que de forma direta protegem os

tecidos contra o ataque de bactérias (DENNISON; VAN DYKE, 1997), como por na doença periodontal, na qual inúmeros periodontopatógenos, exemplo, principalmente os gram-negativos anaeróbios е facultativos como actinomycetemcomitans, possuem a capacidade de invadir os tecidos periodontais e estabelecer uma infecção (SPITZNAGEL, et al., 1991; HAUBEK, et al., 2008). Tais patógenos são reconhecidos e eliminados através de uma variedade de mecanismos, sendo predominante a opsonização, a qual é mediada por proteínas do complemento na fase aguda e por anticorpos, após o desenvolvimento da imunidade adquirida (ATTSTRÖM, 1975; CUTLER, ARNOLD; SCHENKEIN, 1993; DENNISON; VAN DYKE, 1997; OHLRICH, 2009). Se o número ou a função das células fagocíticas estiver comprometido, ou se ocorrer a interação ineficiente entre receptores de superfície do fagócito e o patógeno, a progressão da doença periodontal e a sua gravidade são significativamente aumentadas. Assim, a doença periodontal pode estar diretamente relacionada a uma resposta fagocitária alterada (BUTCHER, S.; CHAHEL; LORD, 2000; WENISCH et al., 2000; BUTCHER, S.K. et al., 2001;).

Está cada vez maior o conhecimento do papel dos fagócitos na patogênese da doença periodontal, especialmente com a descoberta e a utilização de novas técnicas moleculares. Além de alterações celulares quanto à função fagocitária, a suscetibilidade à doença periodontal pode estar associada a mecanismos de escape da fagocitose desenvolvidos pelas bactérias, tanto herdados geneticamente quanto ambientalmente adquiridos (DENNISON; VAN DYKE, 1997; KINANE; LAPPIN D, 2001).

Estudos recentes com modelo animal têm demonstrado a fundamental participação dos macrófagos, atuando como fagócitos contra *A. actinomycetemcomitans*, mesmo na ausência de TLR2 ou TLR4, ou sob condições desfavoráveis *in vitro* como infecção viral prévia (GELANI, et al., 2009, LIN; LI, 2009; LIMA, et al., 2010). Esses trabalhos vêm realçar a importância do mecanismo de fagocitose na eliminação de periodontopatógenos, pois quando este se apresenta alterado, por fatores intrínsecos ou extrínsecos, a doença periodontal evolui.

Vários estudos têm revelado um aumento na densidade de mastócitos (célula por mm²) em tecidos periodontais inflamados, quando comparados a tecidos

periodontais clinicamente saudáveis, sugerindo a participação destas células na patogenia da doença, provavelmente nos mecanismos de defesa e/ou fenômenos destrutivos (ZACHRISSON, 1969; KENNETT, et al., 1993; BATISTA; RODINI; LARA, 2005; ARZI et al., 2010). No entanto, a real participação dos mastócitos nas doenças periodontais ainda não foi esclarecida, principalmente quanto a sua atuação como fagócito.

A preferencial localização tecidual dos mastócitos, logo abaixo e dentro do revestimento epitelial das mucosas, favorece o contato imediato desta célula com patógenos invasores (STEINSVOLL; HELGELAND; SCHENCK, 2004; JAMUR, 2005). Os mastócitos são células de longa duração e possuem a capacidade de responder várias vezes ao mesmo estímulo. Por essas razões, os mastócitos estão muito bem preparados para um papel primário na defesa do hospedeiro contra ataques microbianos (FÉGER, et., 2002), sendo considerada uma célula imunidade fundamental tanto na inata quanto adquirida (STEINSVOLL; HELGELAND; SCHENCK, 2004). Estudos in vitro têm revelado que mastócitos de diferentes espécies são capazes de fagocitar, processar e apresentar antígenos tão eficientemente quanto os macrófagos (ECHTENACHER, et al., 1996; MALAVIYA, et al., 1996; ABRAHAM; AROCK, 1998; ABRAHAM; MALAVIYA, 2000; HENZ et al., 2001). Sabendo que A. actinomycetemcomitans é uma das bactérias amplamente relacionadas à doença periodontal inflamatória e que o seu componente LPS participa da ativação de células inflamatórias, e que não foram encontradas, na literatura, abordagens sobre mastócito atuando como fagócito na doença periodontal, fomos instigados a avaliar a atividade fagocítica dos mastócitos frente ao periodontopatógeno A. actinomycetemcomitans, além de comparar sua capacidade fagocítica com a dos macrófagos, considerados fagócitos profissionais.

Desta forma, foram realizados ensaios fagocíticos *in vitro*, e posterior coloração com laranja de acridina, de mastócitos murinos oriundos da medula óssea e de macrófagos peritoneais murinos. O corante fluorescente laranja de acridina ligase aos ácidos nucléicos (McDOUGALD et al., 1998); quando na dupla fita de DNA, o fluorocromo fluoresce na cor verde; quando se liga à fita única de RNA, fluoresce na cor laranja (COLWELL, 2000; RIGLER, 2010). Vários autores têm utilizado com sucesso este corante, muitas vezes como marcador microbicida, demonstrando que

o DNA de microrganismos vivos cora em verde e, de mortos, em laranja (WENISCH et al., 2000; EICK et al., 2000; GASPAROTO et al., 2011).

A análise qualitativa minuciosa de nossas lâminas microscópicas, através da microscopia confocal a laser, possibilitou a obtenção de imagens de alta resolução através de secções ópticas finas, posteriormente agrupadas, com a reconstrução tridimensional; o que permitiu, desta forma, identificar se as bactérias estavam realmente internalizadas ou não (aderidas na superfície celular). De fato, após desafio *in vitro* por 1 hora, foi possível observar a real internalização das bactérias *A. actinomycetemcomitans* e *E. coli* nos diferentes tipos celulares do presente trabalho, permitindo a confiabilidade do ensaio fagocítico e posterior análise quantitativa.

Baseando-se nesta metodologia, nossos resultados confirmaram a real participação dos mastócitos periodontopatógeno Α. como fagócitos do valores percentuais destas células com actinomycetemcomitans. Altos actinomycetemcomitans internalizados foram obtidos, principalmente na ausência de opsonização com complemento. Isto pode sugerir que A. actinomycetemcomitans opsonizados não foram fagocitados, pelos mastócitos, com a mesma eficiência que A. actinomycetemcomitans não opsonizados ou, contrariamente, que as bactérias opsonizadas foram mortas pelas células. Independente, estes resultados indicam que o reconhecimento desta bactéria, pelos mastócitos, independente do receptor de complemento tipo 3 (CR3) também ocorre e parece ter implicações diferentes. Resultados semelhantes foram observados, por nós, após desafio dos mastócitos com *E. coli*, comparando-se presença ou não de opsonização.

Atualmente, sabe-se que a membrana de mastócitos contém vários receptores/moléculas, incluindo aquelas que promovem o reconhecimento e a ligação bacteriana. Os mastócitos apresentam dois mecanismos básicos de reconhecimento microbiano: opsoninas-dependente (via receptores para opsoninas séricas como o FcεR, o FcγR e o CR3, os quais podem facilitar a ativação de mastócitos por bactérias opsonizadas com anticorpos IgE, IgG ou moléculas do sistema complemento) (ABRAHAM; MALAVIYA, 1997), e opsoninas-independente (via integrinas, moléculas CD48 e receptores *Toll-like*) (MALAVIYA et al., 1999; MARSHALL & JAWDAT, 2004). Nossos resultados sugerem a participação de ambos os receptores no reconhecimento e ingestão de *A. actinomycetemcomitans* 

pelos mastócitos, e corroboram Malaviya et al., 1999, que demonstraram o reconhecimento de *E. Coli* (bactéria também gram-negativa), por mastócitos, independente do receptor de complemento (CR3), e sim através da proteína CD48 (ancorada a glycosylphosphatidylinosiltol-GPI), localizada na membrana celular, facilitando a fagocitose e morte da bactéria.

Vale ressaltar que os mastócitos expressam TLR1, 2, 3, 4, 6 e 9 (APPLEQUIST; WALLIN; LJUNGGREN, 2002; MARSHALL; JAWDAT, 2004) que interagem com diversos produtos bacterianos, como LPS, mediado por receptores TLR4, e peptidoglicanas (PGN) através de TLR2 (STASSEN et al., 2001; SUPAJATURA et al., 2001), podendo a via TLR representar outra via de reconhecimento e internalização do periodontopatógeno estudado por nós. Porém, novos estudos são necessários para desvendar quais receptores membranosos dessas células estão envolvidos mais frequentemente e eficientemente no reconhecimento e ingestão de *A. actinomycetemcomitans*.

Em nosso estudo, altos valores percentuais de mastócitos, apresentando mais que cinco bactérias *A. actinomycetemcomitans* internalizadas, foram detectados, em especial na ausência de opsonização e na proporção 1:10. A partir da metodologia utilizada neste estudo, não foi possível verificar a viabilidade das bactérias internalizadas. Caso estejam viáveis, é possível que os mastócitos promovam um refúgio intracelular para as bactérias *A. actinomycetemcomitans*, como abordado previamente por Féger et al., 2002, em sua revisão sobre o papel dos mastócitos nos mecanismos de defesa contra bactérias.

Diferentemente dos mastócitos, e de acordo com nossos achados, os macrófagos com bactérias internalizadas apresentaram-se menos frequentes quando as bactérias não estavam opsonizadas, sugerindo que o complemento possibilita uma melhor eficácia desta célula na fagocitose tanto de *A. actinomycetemcomitans* como de *E. coli.* Além disso, quando comparamos os valores percentuais de mastócitos com bactérias internalizadas sem complemento com macrófagos com *A. actinomycetemcomitans* internalizados com complemento, foi possível detectar, em uma das proporções (1:10), que os valores percentuais foram estatisticamente maiores para os mastócitos (sem opsonização) em relação aos macrófagos (com opsonização), sugerindo, em um primeiro momento de

reflexão, que os mastócitos, frente a A. actinomycetemcomitans não opsonizados, realizam fagocitose mais eficientemente que os macrófagos na sua melhor condição, ou seja, frente a bactéria opsonizada com complemento. Neste contexto, podemos refletir quanto à atuação dos mastócitos como fagócitos profissionais de A. actinomycetemcomitans na doença periodontal induzida por placa dentobacteriana, apresentando uma importante função, juntamente com outras células, na imunidade contra agentes infecciosos, como observado em outros modelos experimentais (ECHTENACHER et al., 1996; MALAVIYA et al., 1996). Esta importante função viria somar-se a outras, como a produção e a liberação de mediadores químicos, citocinas e quimiocinas (FÉGER et al., 2002). Porém, outras evidências científicas demonstraram que bactérias internalizadas através da via opsonina-independente, expressam adesinas que subvertem os mecanismos fagocíticos dos mastócitos, promovendo assim a sobrevivência do microrganismo no interior deles. Nestas condições, os mastócitos passariam a servir como reservatórios de bactérias viáveis, resultando em efeitos deletérios ao hospedeiro (FÉGER et al., 2002). É importante realçar que mastócitos interagindo com bactérias gram-negativas, em meio contendo componentes séricos, foram capazes, além de fagocitar, matar tais bactérias, por meio de mecanismos oxidativos e não oxidativos (MALAVIYA et al., 1994). De fato, nossos resultados revelaram valores percentuais menores de mastócitos apresentando bactérias opsonizadas em seu interior em comparação aos mastócitos com bactérias não opsonizadas, o que pode refletir que houve fagocitose com morte bacteriana no ambiente rico em opsoninas (complemento).

Em resumo, apesar de mastócitos serem capazes de fagocitar e matar várias bactérias na presença de opsoninas, algumas bactérias podem alterar essa capacidade em seu benefício, quando em microambientes pobres de opsoninas (FÉGER et al., 2002). Experimentos *in vivo* demonstraram que camundongos deficientes de C3 exibem atraso na eliminação de bactérias, além de redução da desgranulação de mastócitos peritoneais, da produção de TNF-α e do recrutamento de neutrófilos, sugerindo que produtos derivados do sistema complemento são essenciais para a ativação e a capacidade microbicida de mastócitos após desafio bacteriano (PRODEUS et al.,1997).

Quando os mastócitos interagem com bactérias opsonizadas, além de realizarem suas funções fagocítica e microbicida, executam efetivamente sua função primordial, a liberação de mediadores pré-formados e/ou neo-sintetizados, conduzindo desta forma a chegada de mais células inflamatórias no local e agudização do processo inflamatório (SHER et al., 1979 e MALAVIYA et al., 1999). Por outro lado, vários patógenos bacterianos expressam toxinas, que ora inibem a liberação de mediadores químicos ora conduzem a liberação exacerbada deles pelos mastócitos, causando sérios efeitos citotóxicos aos tecidos (FÉGER et al., 2002; STEINSVOLL; HELGELAND; SCHENCK, 2004). Desta forma, extrapolando nossos resultados *in vitro* para a doença periodontal em humanos, podemos predizer que a resposta fagocítica dos mastócitos, na referida doença, pode ser ambígua, ora protege o indivíduo contra periodontopatógenos através da fagocitose e morte bacteriana, ora leva a maior destruição e progressão da doença pela liberação exacerbada de seus mediadores, e ou por permitir um refúgio bacteriano em seu interior.

Apesar de neste trabalho não ter sido avaliada a produção de mediadores pró-inflamatórios pelos mastócitos, o sobrenadante dos ensaios fagocíticos com ambos os tipos celulares, foi armazenado a -80°C e pretendemos utilizá-los para futuras análises, investigando a participação dos mastócitos ativados por *A. actinomycetemcomitans, o*psonizados ou não, como fontes de importantes mediadores químicos e de citocinas imunoreguladoras.

Um estudo recente realizado por KÖCKRITZ-BLICKWEDE et al., em 2008, demonstraram ainda que os mastócitos possuem a capacidade de eliminar bactérias, por meio de mecanismos independentes da fagocitose, aprisionando tais microrganismos em estruturas extracelulares contendo DNA, histonas, triptase e peptídeo antimicrobiano LL-37. Tais estruturas são denominadas de MCETs (Mast Cells Extracellular Traps). Com o rompimento dos MCETs, ocorre redução significativa do efeito antimicrobiano dos mastócitos, sugerindo que "traps" extracelulares intactos são essenciais para a inibição efetiva do crescimento bacteriano. A formação de MCETs, além de promover o sequestro dos microrganismos, também minimiza os danos aos tecidos adjacentes, não permitindo que substâncias nocivas sejam dispersas nos tecidos não infectados. O estudo destes mecanismos de morte bacteriana, pelos mastócitos, focando o A.

actinomycetemcomitans, vem colaborar com o maior conhecimento da interação deste periodontopatógeno com os mastócitos, na doença periodontal, constituindo assim mais um objetivo de nossas análises futuras nesta linha de pesquisa.

Embora exista um vasto conhecimento científico a respeito da patogênese das doenças periodontais, estudos ainda precisam ser realizados para um melhor conhecimento sobre os eventos biológicos envolvidos nesta patologia. Contudo, esta presente investigação possibilitou, pela primeira vez, a verificação da capacidade fagocítica do *A. actinomycetemcomitans* pelos mastócitos, comprovando sua atuação como fagócito profissional tanto quanto é o macrófago. Em seguida, pretendemos averiguar a capacidade microbicida dos mastócitos frente ao *A. actinomycetemcomitans*, opsonizados ou não, contribuindo desta forma para o melhor entendimento da real importância da fagocitose bacteriana pelos mastócitos nas doenças periodontais inflamatórias e auxiliando no direcionamento de novas estratégias de prevenção, assim como no desenvolvimento de novos procedimentos terapêuticos.

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 fagocítica frente ao periodontopatógeno A. actinomycetemcomitans, sugerindo o seu papel como fagócitos profissionais na patogênese da doença periodontal induzida por placa dentobacteriana.
- Os valores percentuais de mastócitos Α. com actinomycetemcomitans internalizados, na ausência de opsonização com complemento, foram maiores que aqueles na presença da opsonização, sugerindo a participação de receptores opsoninas-independentes no reconhecimento deste patógeno pelos mastócitos, além do receptor de complemento tipo 3 (CR3).
- ✓ Comparando os dois tipos celulares, mastócitos e macrófagos, verificou-se que ambas as células apresentaram importante atividade fagocítica contra A. actinomycetemcomitans, porém os valores percentuais de mastócitos com bactérias internalizadas sem complemento foram maiores que aqueles de macrófagos com A. actinomycetemcomitans internalizados com complemento, em uma das proporções (1:10).

Referências

#### **REFERÊNCIAS**

AAP - AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY Consensus report. Periodontal diseases: epidemiology and diagnosis. Annals Periodontol, v.1, n.1, p.216-222, Nov. 1996.

AAP - AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. International Workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. Annals Periodontol, v.4, n.1, p.7-37, Dec. 1999.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. Hipersensibilidade imediata. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai, S. Imunologia celular e molecular. 6th. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 441-462.

ABRAHAM, S.N.; MALAVIYA, R. Mast Cells in Infection and Immunity. Infect Immun, v.65, n.9, p. 3501-3508, Sep. 1997.

ABRAHAM, S.N.; AROCK, M. Mast cells and basophils in innate immunity. Semin Immunol. v.10, n.5, p.373-81, Oct. 1998.

ABRAHAM, S.N.; MALAVIYA, R. Mast cell modulation of the innate immune response to enterobacterial infection. Adv Exp Med Biol. v.479 p.91-105, 2000.

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.

AROCK, M. et al. Phagocytic and tumor necrosis factor alpha response of human mast cells following exposure to gram-negative and gram-positive bacteria. Infect Immun. v.66, n.12, p.6030-34, Dec. 1998.

ARZI, B. et al. Presence and quantification of mast cells in the gingiva of cats with tooth resorption periodontitis and chronic stomatitis. Arch Oral Biol. v.55, n.2, p.148-54, Feb. 2010.

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

ASSUMA, R. et al. IL-1 e TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. J Immunol, v.160, n.1, p.403-9, Jan. 1998.

ATKINS, F.M. et al. Interactions between mast cells, fibroblasts and connective tissue components. Int Arch Allergy Appl Immunol, v.77, n. 1-2, p.96-102, 1985.

ATTSTRON, R. Studies on neutrophil polymorphonuclear leukocytes at the dentogingival junction in gingival health and disease. J Periodont Res, v.8, p.1-15, 1971. Supplement 8.

ATTSTRON, R. The roles of gingival epithelium and phagocytosing leukocytes in gingival defence. J Clin Periodontol. v.2 n.1, p.25-32, Feb. 1975.

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.

BARNETT, M.L. The fine structure of human epithelial mast cells in periodontal disease. J Periodont Res, v.8, n.6, p.371-80, Nov. - Dec. 1973.

BARNETT, M.L. The fine structure of human connective tissue mast cells in periodontal disease. J Periodont Res, v.9, n.2, p.84-91, Mar.-Apr. 1974.

BERGLUNDH, T.; LILJENBERG, B.; LINDHE, J. Some cytokine profiles of T-helper cells in lesions of advanced periodontitis. J Clin Periodontol, v.29, n.8, p.705-709. Aug. 2002.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. J Periodontol, v.64, n.5, p.474-84, May 1993. Supplement.

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

BOOTH, J.W. et al. Contrasting requirements for ubiquitylation during Fc receptor-mediated endocytosis and phagocytosis. EMBO J, v.21, n.3, p.251-58, 2002.

BRANDTZAEG, P.; KRAUS, F.W. Autoimmunity and periodontal disease. Odontol Tidskr, v.73, p.285-393, June 1965.

BROWN, E.J. Complement receptors and phagocytosis. Curr. Opin. Immunol. v.3, n.1, p.76-82, Feb. 1991.

BROWN, E. Complement receptors, adhesion, and phagocytosis. In: ROSALES, C. (Ed.) Molecular Mechanisms of Phagocytosis. Georgetown, TX: Landes Bioscience, 2005. p. 49-57.

BROWN, G.D; GORDON, S. Immune recognition. A new receptors for beta-glucans. Nature. v.413, n.6851, p.36-37, 2001.

BUTCHER, S.; CHAHEL, H.; LORD, J.M. Review article: ageing and the neutrophil: no appetite for killing? Immunology. v.100, n.4, p.411-16 Aug. 2000.

BUTCHER, S.K. et al. Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans. J Leukoc Biol. v.70, n.6 p.881-86, Dec. 2001

CARRANZA, F.A.J.; CABRINI, R.L. Mast cells in human gingiva. Oral Surg, v.8, n.10, p.1093-9, Oct. 1955.

CHANG, Y.C. et al. Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. J Periodont Res, v.37, n.3, p.196-203, June 2002.

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. 2010.

COESTERTON, J.W. et al. Bacterial biofilms in nature and disease. Annu Rev Microbiol, v.41, p.435-64, Oct. 1987.

COLE, K.C.; SEYMOUR, G.J.; POWELL, R.N. Phenotypic and functional analysis of T cells extracted from chronically inflamed human periodontal tissues. J Periodontol, v.58, n.8, p.569-73, Aug. 1987.

CONSOLARO, A. Infiltrado em formação: as células chegam para fagocitar e reconhecer o agressor. In: \_\_\_\_\_. Inflamação e reparo: um sílabo para a compreensão clínica e implicações terapêuticas. Maringá: Dental Press, 2009. p.99-121.

COLWELL, R.R. Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. J Infect Chemother. v.6, n.2, p.121-5, Jun. 2000.

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.

CUTLER, C.W.; ARNOLD, R.R; SCHENKEIN, H.A. Inhibition of C3 and IgG proteolysis enhances phagocytosis of Porphyromonas gingivalis. J Immunol. v.151, n.12, p. 7016-29, Dec. 1993.

DENNISON, D. K.; VAN DYKE, T.E. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. Periodontol 2000. v.14, p.54-78, 1997.

DZINK, J.L. et al. Gram negative associated species with active destructive periodontal lesions. J Clin Periodontol, v.12, n.8, p.648-59, Sept. 1985.

DZINK, J.L.; SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE. The predominant cultivable microbiota of active and inactive periodontal lesions. J Clin Periodontol, v.15, n.5, p.316-23, May 1988.

EBERSOLE, J..; CAPPELLI D. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. Periodontol 2000, v.23, n.1, p.19-49, June 2000.

ECHTENACHER, B; MÄNNEL, D.N.; HÜLTNER, L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. Nature. v.381, n.6577, p.75-7, May. 1996.

EICK, S. et al. Phagocytosis of periodontopathogenic bacteria by crevicular granulocytes is depressed in progressive periodontitis. Infection. v.28, n.5, p.301-4, Sep. 2000.

FÉGER, F. et al. The role of mast cells in host defense and their subversion by bacterial pathogens. Trends Immunol. v.23, n.3, p.151-58, Mar. 2002.

FIVES-TAYLOR, P.M.; MEYER, D.H.; MINTZ, K.P. Characteristics of Actinobacillus actinomycetemcomitans invasion of and adhesion to cultured epithelial cells. Adv Dent Res, v.9, n.1, p.55-62, Feb 1995.

FIVES-TAYLOR, P.M. et al. Virulence factors of Actinobacillus actinomycetemcomitans. Periodontol 2000, v.20, p.136-167, Jun. 1999.

FRAME, B.; NIXON, R.K. Bone-marrow mast cells in osteoporosis of aging. N Engl J Med, v.279, n.12, p.626-30, Sept. 1968.

GALBRAITH, G.M. et al. Tumor necrosis factor alpha production by oral leucocytes: influence of tumor necrosis factor genotype. J Periodontol, v.69, n.4, p.428-33, Apr. 1998.

GARLET, G.P. et al. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. J. Periodont. Res, v.38, n.2, p.210–217, Apr. 2003.

GASPAROTO, T.H. et al. Differences between salivary and blood neutrophils from elderly and young denture wearers. J Oral Rehabil. v.38, n.1, p.41-51, Jan. 2011.

GELANI, V. et al. The role of toll-like receptor 2 in the recognition of Aggregatibacter actinomycetemcomitans. J Periodontol. v.80, n.12, p.2010-19, Dec. 2009.

GENCO, R.J. Host response in periodontal diseases: current concepts. JPeriodontol, v.63, n.4, p.338-55, Apr. 1992. Supplement.

GEMMEL, E.; YAMAZAKI, K.; SEYMOUR, G.J. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocyte response. Crit Rev Oral Biol Med, v.13, n.1, p.17-34, Jan. 2002.

GEMMELL, E.; CARTER, C.L.; SEYMOUR, G.J. Mast cells in human periodontal disease. J Dent Res, v.83, n.5, p.387-7, May 2004.

GOLDHABER, P. Heparin enhancement of factors stimulating bone resorption in tissue culture. Science v.147, n.3656, p. 407-8, Jan. 1965.

GORE, E.A. et al. Interleukin-1beta+3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. J Clin Periodontol, v.25, n.10, p.781-85, Oct. 1998.

GREENBERG, S.; SILVERSTEIN S.C. Phagocytosis. In: PAUL, W (Ed). Fundamental Immunology. New York: Raven Press, 1993. p.941-64.

GÜNHAN, M. et al. Mast cells in periodontal disease. Ann Dent, v.50, n.1, p.25-9, Summer, 1991.

HAFFAJEE, A.D., SOCRANSKY, S.S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000, v.5, p.78-111, June 1994.

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, p.237-242, Jan. 2008.

HAZENBOS, W.L.W.; BROWN, E.J. Phagocytosis: receptors and biology. In: ERNST, J.D.; STENDAHL, O. (Ed). Phagocytosis of Bacteria and Bacterial Pathogenicity. New York: Cambridge University Press, 2006. p.4-54.

HENZ, B.M. et al. Mast cells as initiators of immunity and host defense. Exp Dermatol. v.10, n.1, p.1-10, Feb. 2001.

HIROSE, M. et al. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. J Periodontol, v.72, n.5, p.590-7, May 2001.

HORTON, J.E.; OPPENHEIN, J.J.; MERGENHAGEN, S.E. A role of cell mediated immunity in the pathogenesis of periodontal disease. J Periodontol, v.45, n.5, p.351-60, May 1974.

JAMUR, M.C. Mastócitos. In: CARVALHO, H.F.; COLLARES-BUZATO, C.B. (Org.). Células: uma abordagem multidisciplinar. Barueri, SP: Manole, 2005. p.382-91.

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

JEFFCOAT, M.K.; REDDY, M.S. Progression of probing attachment loss in adult periodontitis. J Periodontol, n.62, n.3, p.185-9, Mar. 1991.

KENNETT, C.N. et al. Comparative histochemical and biochemical studies of mast cell tryptase in human gingiva. J Periodontol. v.64, n.9, p.870-7, Sep. 1993.

KINANE, D.; LAPPIN D. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. Acta Odontol Scand. 2001;59(3):154-60.

KINANE, D.F; ATTSTRÖM, R. 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.130-31, Oct. 2005.

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, July 2000.

KOLENBRANDER, P.E.; LONDON, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. J Bacteriol, v.175, n.11, p.3247-52, June 1993.

KORNMAN, K.S. et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. J Clin Periodontol, v.24, n.1, p.72-7, Jan. 1997.

LEHNER, T. et al. Sequential cell mediated immune responses in experimental gingivitis in man. Clin Exp Immunol, v.16, n.3, p.481-92, Mar. 1974.

LIMA, H.R. et al. The essential role of toll like receptor-4 in the control of Aggregatibacter actinomycetemcomitans infection in mice. J Clin Periodontol. v.37, n.3 p.248-54, Mar. 2010

LIN, Y.L.; LI, M. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus inhibit oral bacteria-induced macrophage activation and phagocytosis. Oral Microbiol Immunol. v.24, n.3, p.243-8, Jun. 2009.

LISTGARTEN, M.A. Pathogenesis of periodontitis. J Clin Periodontol, v.13, n.5, p.418-30, May 1986.

LISTGARTEN, M.A. The structure of dental plaque. Periodontol 2000, v.5, p.52-65, June 1994.

LOESCHE, W. Bacterial mediators in periodontal disease. Clin Infect Dis. v.16, p.203-210, June 1993. Supplement 4.

MALAVIYA, R. et al. Mast Cell Phagocytosis of FimH-Expressing Enterobacteria. J Immunol, v.152, n.4, p.1907-1914, Feb. 1994.

MALAVIYA, R. et al. Mast cells process bacterial Ags through a phagocytic route for class I MHC presentation to T cells. J Immunol, v.156, n.4, p.1490-6, Feb. 1996.

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. 1996.

MALAVIYA, R.; ABRAHAM, S.N. Clinical implications of mast cell-bacteria interaction. J Mol Med, v.76, n.9, p.617-623, Aug. 1998.

MALAVIYA, R.; ABRAHAM, S.N. Mast cell modulation of immune responses to bacteria. Immunol Rev, v.179, p.16-24, Feb. 2001.

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.841-46, Jun. 2000.

MARSHALL, J.S.; JAWDAT, D.M. Mast cells in innate immunity. J Allergy Clin Immunol. v.114, n.1, p.21-7, Jul. 2004.

MATEJKA, M. et al. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. J Periodontol Res, v.33, n.8, p.517-8, Nov. 1998.

McCAWLEY, L.J.; MATRISIAN, L.M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! Curr Opin Cell Biol, v.13, n.5, p.534-40, Oct. 2001.

METCALFE, D.D.; BARAM, D.; MEKORI, Y.A. Mast cells. Physiol Rev, v.77, n.4, p.1033-79, Oct. 1997.

MOORE, K.W. Interleukin-10. Annu Rev Immunol, v.11, p.165-190, 2003.

MURCIANO, C. et al. Influence of Aging on Murine Neutrophil and Macrophage Function against Candida albicans. FEMS Immunol Med Microbiol. v.53, p.214-221, 2008.

NEIDERS, M.E. et al. Bone reaction in experimental periodontitis induced by delayed hypersensitivity. J Periodontol, v.50, n.3, p.140-5, Mar. 1979.

NISENGARD, RJ. The role of immunology in periodontal disease. J Periodontol, v.48, n.9, p.505-16, Sept. 1977.

NØRSKOV-LAURITSEN, N. & KILIAN, M. Reclassification of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Haemophilus aphrophilus, Haemophilus paraphrophilus and Haemophilus segnis as Aggregatibacter actinomycetemcomitans gen. nov., comb. nov., Aggregatibacter aphrophilus comb. nov. and Aggregatibacter segnis comb. nov., and emended description of Aggregatibacter aphrophilus to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. Int J Syst Evol Microbiol v.56, p.2135–2146, 2006.

OHLRICH, E.J.; CULLINAN, M.P.; SEYMOUR, G.J. The immunopathogenesis of periodontal disease. Aust Dent J, v.54, p.S2-S10, Sep. 2009. Supplement 1.

OKADA, H. et al. The function of gingival lymphocytes on the establishment of human periodontitis. Adv Dent Res, v.2, n.2, p.364-67, Nov. 1988.

OOSHIMA, T. et al. Occurrence of periodontal bacteria in healthy children: a 2-year longitudinal study. Community Dent Oral Epidemiol, v.31, n.6, p.417-425, Dec. 2003.

PAGE, R.C.; SCHROEDER, H.E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. Lab Invest, v.34, n.3, p.235-49, Mar. 1976.

PAGE, R.C. et al. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implication and future directions. Periodontol 2000, v.14, p.216-48, June 1997.

PAGE, R.C. Periodontal diseases: a new paradigm. J Dent Educ, v.62, n.10, p.812-21, Oct. 1998.

PRODEUS, A.P. et al. Impaired mast cell-dependent natural immunity in complement C3-deficient mice. Nature. v.390, n.6656, p.172-75, Nov. 1997.

QU, Z. et al. Synthesis of basic fibroblastic growth factor in 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.

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.

RIGLER, R. Fluorescence and single molecule analysis in cell biology. Biochem Biophys Res Commun. v.396, n.1, p.170-5, May. 2010.

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.

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.146-153, 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.192-199, May. 2007.

SANDROS, J. et al. Cytokine responses of oral epithelial cells to Porphyromonas gingivalis infection. J Dent Res, v.79, n.10, p.1808–1814, Oct. 2000

SANTOS, J.M. Mastócitos nas gengivites crônicas do homem. Belo Horizonte, 1961. 58p. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Odontologia e Farmácia, Universidade de Minas Gerais.

SCAREL-CAMINAGA, R.M. et al. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis. J Clin Periodontol, v.31, n.6, p.443-48, June 2004.

SEYMOUR, G.J.; POWELL, R.N.; DAVIES, W.I. Conversion of a stable T-cell lesion to a progressive B-cell lesion in the pathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: an hypothesis. J Clin Periodontol, v.6, n.5, p.267-77, Oct. 1979.

SEYMOUR, G.J. et al. Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanisms. J Periodontal Res, v. 28, n. 6, p. 478–486, Nov.1993

SCHENKEIN, H. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. Periodontology 2000, v.40, n.1, p.77-93, Feb. 2006.

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.

SHELTON, L. E.; HALL, W. B. Human gingival mast cells. J. periodont. Res, v.3, n.3, p. 214-223, 1968.

SHER, A. et al. Complement receptors promote the phagocytosis of bacteria by rat peritoneal mast cells. Lab Invest. v.41, n.6, p.490-99, Dec. 1979.

SHIMADA, Y. et al. Association of tumor necrosis factor receptor type 2 +587 gene polymorphism with severe chronic periodontitis. J Clin Periodontol, v.31, n.6, p. 463-9, June 2004.

SILVERSTEIN, S.C.; STEINMAN, R.M.; COHN, Z.A. Endocytosis. A. Rev. Biochem, v.46, p.669, 1977.

SOCRANSKY, S.S. et al. New concepts of destructive periodontal disease. J Clin Periodontol, v.11, n.1, p.21-32, Jan. 1984.

SPITZNAGEL, J. et al. Regulation of leukotoxin in leukotoxic and nonleukotoxic strains of Actinobacillus actinomycetemcomitans. Infect Immun, v.59, n.4, p.1394-1401, Apr. 1991.

STASSEN, M. et al. IL-9 and IL-13 production by activated mast cells is strongly enhanced in the presence of lipopolysaccharide: NF-kappa B is decisively involved in the expression of IL-9. J Immunol. v.166, n.7, p.4391-98, Apr. 2001.

STEINSVOLL, S.; HELGELAND, K.; SCHENCK, K. Mast cells – a role in periodontal diseases? J Clin Peridontol, v.31, n.6, p.413-9, June 2004.

STOUFI, E.D. et al. Phenotypic analyses of mononuclear cells recovered from healthy and diseased human periodontal tissues. J Clin Immunol, v.7, n.3, p.235-45, May 1987.

SUPAJATURA, V. et al. Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. J Immunol. v.167, n.4, p.2250-56, Aug. 2001.

SUSIN, C. et al. Periodontal attachment loss attributable to cigarette smoking in an urban Brazilian population. J Clin Periodontol, v.31, n.11, p.951-958, Nov. 2004.

TAKAHASHI, N. et al. Interleukin-1 receptor-associated kinase-M in gingival epithelial cells attenuatesthe inflammatory response elicited by Porphyromonas gingivalis. J Periodont Res, v. ,n. , p. , 2010.

TAUBMAN, M.A. et al. Phenotypic studies of cells from periodontal disease tissue. J Periodont Res, v.19, n.6, p.537-90, Nov. - Dec. 1984.

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.

TENG, Y.T. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. Crit Rev Oral Biol Med, v.4, n.4, p.237-52, 2003.

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.447-454, Oct. 2006.

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

VON KÖCKRITZ-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. 2008.

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, July 1995.

WELLE, M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. J Leukoc Biol, v.61, n.3, p.233-45, Mar. 1997

WENISCH, C. et al. Effect of age on human neutrophil function. J Leukoc Biol. v.67, n.1, p.40-5, Jan. 2000.

WIERZBICKI, M.; BRZEZIŃSKA-BŁASZCZYK, 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.

WILLIAMS, R.C. Periodontal disease. N Engl J Med, v.322, n.6, p.373-82, Feb. 1990.

WILSON, M.; HENDERSON, B. Virulence factors of Actinobacillus actinomycetemcomitans relevant to the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. FEMS Microbiol Rev, v.17, n.4, p. 365-379, Dec. 1995.

YAMAZAKI, K.; YOSHIE, H.; SEYMOUR, G.J. T cell regulation of the immune response to infection in periodontal diseases. Histology and histopathology, v.18, n.3, p.889-896, Jul. 2003.

ZACHRISSON, B.U. Mast cells of the human gingiva. II. Methacromatic cells at low pH in healthy and inflamed tissue. J Periodont Res, v.2, p. 87-89, 1967.

ZADEH, H.H.; NICHOLS, F.C.; MIYASAKI, K.T. The role of cell-mediated immune response to Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in periodontitis. Periodontol 2000, v.20, p.239-88, June 1999.

**Apêndices** 

**APENDICE 1** – Avaliação percentual da fagocitose de *A. actinomycetemcomitans* por parte dos BMMC, após desafio, por 1 hora, com diferentes proporções de célula por *A. actinomycetemcomitans* ora opsonizados ou não. Os valores percentuais apresentados representam a média de três experimentos independentes, seguidos do desvio padrão entre parênteses.

D	Mastócitos				
Proporções Mastócito : A.a.	Ausentes de bactérias (%)	≤ 5 bactérias fagocitadas (%)	> 5 bactérias fagocitadas (%)	Total (%)	
Com complemento					
1:5	49 (± 5,31) *	30 (± 5,90)	21 (± 3,55)	100	
1:10	49 (± 6,16) **	40 (± 3,68)	11 (± 5,18) ***	100	
1:25	37 (± 6,12)	19 (± 4,49)	44 (± 5,43)	100	
Sem complemento					
1:5	33 (± 3,68) *	47 (± 8,04)	20 (± 5,79)	100	
1:10	20 (± 3,26) **	32 (± 5,18)	48 (± 2,86) ***	100	
1:25	26 (± 4,10)	27 (± 7,40)	47 (± 5,43)	100	

A.a.= Aggregatibacter actinomycetemcomitans.

Símbolos iguais diferem estatisticamente \* P< 0,05;\*\* P< 0,01; \*\*\* P< 0,001

**APENDICE 2** – Avaliação percentual da fagocitose de *A. actinomycetemcomitans* por macrófagos peritoneais murinos, após desafio, por 1 hora, com diferentes proporções de célula por *A. actinomycetemcomitans* ora opsonizados ou não. Os valores percentuais apresentados representam a média de três experimentos independentes, seguidos do desvio padrão entre parênteses.

Duamana a a a	Macrófagos			
Proporções Macrófago : A.a.	Ausentes de bactérias (%)	≤ 5 bactérias fagocitadas (%)	> 5 bactérias fagocitadas (%)	Total (%)
Com complemento				
1:5	38 (± 4,78) *	49 (± 5,71)	13 (± 2,05) ##	100
1:10	42 (± 0) **	46 ( $\pm$ 2,35) $^{\alpha}$	12 (± 2,35)	100
1:25	32 (± 10,27) #	33 (± 2,16)	35 (± 9,84) $^{\beta}$	100
Sem complemento				
1:5	57 (± 5,71) *	39 (± 4,32)	4 (± 2,16) ##	100
1:10	58 (± 5,90) **	$34 (\pm 5,31)^{\alpha}$	8 (± 3,09)	100
1:25	59 (± 10,07) <sup>#</sup>	28 (± 7,36)	13 (± 3,09) $^{\beta}$	100

A.a.= Aggregatibacter actinomycetemcomitans.

Símbolos iguais diferem estatisticamente \*, #,  $\alpha$ ,  $\beta$  P<0.05; \*\*, ## P<0.01;

**APENDICE** 3 – Avaliação percentual da fagocitose de *E. coli* pelos diferentes tipos celulares, após desafio, por 1 hora, na proporção de 1 célula para 10 *E. coli* ora opsonizados ou não. Os valores percentuais apresentados representam a média de três experimentos independentes, seguidos do desvio padrão entre parênteses.

	Células			
Célula x E.c.	Ausentes de bactérias (%)	≤ 5 bactérias fagocitadas (%)	> 5 bactérias fagocitadas (%)	Total (%)
Com complemento				
Mc x E.c. mO x E.c.	50 (± 2,05) * 22 (± 3,39) **	31 (± 5,71) 40 (± 1,69) <sup>#</sup>	19 (± 7,76) 38 (± 4,96) ##	100 100
Sem complemento				
Mc x E.c	34 (± 3,85) *	37 (± 7,03)	29 (± 3,26)	100
mO x E.c	38 (± 2,49) **	48 (± 1,24) <sup>#</sup>	14 (± 3,29) ##	100

E.c = Escherichia coli; Mc= Mastócitos; mO= Macrófagos. Símbolos iguais diferem estatisticamente \*, #, \*\*, ## P< 0,01;

<u>Anexos</u>



## Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75. – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73 PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

> Comissão de Ética no Ensíno e Pesquisa em Animais Fone: (14)3235-8356 e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 028/2010

Bauru, 13 de agosto de 2010.

Senhora Professora.

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado Avaliação da capacidade fagocítica de mastócitos frente ao periodontopatógeno Aggregatibacter Actinomycetemcomitans, de autoria de Heliton Gustavo de Lima foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprovando** o projeto foi aceito em reunião desta Comissão realizada no dia **14 de** setembro de **2010**, considerando não haver impedimentos éticos.

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,

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Soares Lara Docente do Departamento de Estomatologia