ELLEN SAYURI ANDO

TOXINA DISTENSORA CITOLETAL (CDT): ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM SOROS DE PACIENTES COM DIFERENTES CONDIÇÕES PERIODONTAIS E SEU EFEITO SOBRE A ATIVIDADE MACROFÁGICA

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

SÃO PAULO

2009

ELLEN SAYURI ANDO

TOXINA DISTENSORA CITOLETAL (CDT): ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM SOROS DE PACIENTES COM DIFERENTES CONDIÇÕES PERIODONTAIS E SEU EFEITO SOBRE A ATIVIDADE MACROFÁGICA

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração:
Microbiologia

Orientador:
Profa. Dra. Márcia Pinto Alves

SÃO PAULO

2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Ando, Ellen Sayuri.
Toxina distensora citoletal (CDT):análise da resposta imune humoral em soros de pacientes com diferentes condições periodontais e seu efeito sobre a atividade macrofágica / Ellen Sayuri Ando. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Marcia Pinto Alves Mayer.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Fatores de virulência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Versão do título para o inglês: Cytolethal distending toxin (CDT): analysis of humoral immunity response in sera of patients with different periodontal conditions and the effect on macrophage activity.

Descritores: 1. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 2. Toxina distensora citoletal 3. IgG 4. Óxido nítrico 5. Macrófago 6. IL - 10
I. Mayer, Marcia Pinto Alves II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
III. Título.

ICB/SBIB0113/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ellen Sayuri Ando.

Título da Tese: Toxina distensora citoletal (CDT): análise da resposta imune humoral em soros de pacientes com diferentes condições periodontais e seu efeito sobre a atividade macrofágica.

Orientador(a): Marcia Pinto Alves Mayer.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (11) 38130900 - telefax : (55) (11) 3818-7438
e-mail: icbsedir@ icb.usp.br

São Paulo, 10 de julho de 2003

PARECER 483/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua trigésima sétima reunião, realizada no dia 27 de junho p.p., analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "Análise da resposta imune humoral específica contra a toxina distensora citoletal em pacientes com diferentes condições periodontais e seu efeito na inibição da atividade macrofágica".

Informo que, após análise e discussão, o referido projeto, foi **aprovado por esta Comissão.**

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. GERHARD MALNIC
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Ilma. Sra.
ELLEN SAYURI ANDO
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

UNIFESP
Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comissão de Ética Médica
Hospital São Paulo/Universidade Federal de São Paulo

São Paulo, 06 de novembro de 1998

Ilmo. (a) Sr. (a)
Pós-Graduando (a) LUIZ ANTONIO DE GENNARO
Curso de Pós-graduação em Imunologia
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UNIFESP

Prezado (a) Pós-graduando (a),

A Comissão de Ética Médica do Hospital São Paulo/Universidade Federal de São Paulo analisou e aprovou o protocolo de pesquisa nº 1524/98 intitulado: "Auto-anticorpos dirigidos a componentes da matriz extracelular em pacientes portadores de *Periodontite Juvenil* localizada".

Atenciosamente,

Prof.Dr. Mauricio M. A. Alchorne
Presidente da Comissão de Ética Médica do
Hospital São Paulo/Universidade Federal de São Paulo

cc.:/ Prof.(a) Dr. (a) Nobuko Yoshida
Chefe do Departamento de Micrbobiologia, Imunologia e Parasitologia da UNIFESP

Rua Pedro de Toledo, 715 - CEP 04039-032 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 576.4584 - FAX (011) 576.4368

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (11) 3091.7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@ icb.usp.br

São Paulo, 02 de fevereiro de 2006.

PARECER 685/CEP

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 62ª reunião, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Identificação de possíveis organismos associados à periodontite agressiva por análise clonal de 16SrRNA* ".

Informo que, após análise e discussão, o referido projeto, foi aprovado por esta Comissão.

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB / USP

Ilmo. Sr.
MARCELO DE FAVERI
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **051** nas fls. **56** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Marcia Pinto Alves Mayer, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "***Toxina distensora citoletal (cdt): análise da resposta imune humoral especifica em soros de pacientes com diferentes condições periodontais e seu efeito na inibição da atividade macrofágica***" do qual participou(aram) o(s) alunos ***Ellen Sayuri Ando e o pesquisador Momtchilo Russo*** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **29.05.08,** com validade de 3 anos.

São Paulo, 29 de maio de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA – ICB/USP

Aos meus queridos pais
Nelson e Tereza pelo apoio
constante e ao meu noivo
Rogério pelo incentivo e
companheirismo.

Obrigada!

Agradecimentos

Primeiramente à Profa. Marcia Mayer pela confiança, incentivo e por transmitir conhecimentos para a pesquisa e também para a vida.

Aos meus tios, primos e amigos que sempre torceram e apoiaram durante todo o tempo.

Aos meus queridos amigos de laboratório Adriana, Alessandra, Amandinha, Ana Carla, César, Clau Ota, Claudinha, Carol, Cristina, Dani, Daniel, Didi, Éricka, Fábio, Felipe, Flávia, João, Juliana, Kris, Léo, Lucas, Josy, Pri, Sil, Talyta, Vera pela convivência, risadas e apoio.

Aos Prof. Gennaro e Prof. Marcelo pela doação das amostras e pela ajuda.

Ao Prof. Joseph DiRienzo pelas amostras cedidas e por me receber em seu laboratório.

Aos amigos de Filadélfia Tainah, Sony, Edwin, Jaime, Alla, Sam, George pela amizade e apoio.

Ao Prof. Momtchilo e à Eliane pelos ensinamentos em Imunologia.

À Rosana pela estatística e amizade.

Às secretárias Alice, Aninha e Naide pelo suporte e paciência.

Aos funcionários da biblioteca do ICB pela ajuda.

O meu sincero agradecimento!

Este trabalho foi subvencionado pela **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) processos número: 03/03318-0 e 03/08598-0

"Escolha um trabalho que você ame e não terá que trabalhar um único dia em sua vida."

Confúcio

RESUMO

ANDO, E.S. **Toxina Distensora Citoletal (CDT):** Análise da resposta imune humoral em soros de pacientes com diferentes condições periodontais e seu efeito sobre a atividade macrofágica. 2009. 114 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans é associado com a etiologia da periodontite agressiva e produz, entre outros fatores de virulência, a toxina distensora citoletal (CDT). CDT é capaz de induzir alterações morfológicas, parada do ciclo celular na fase G2 e apoptose em células eucarióticas. Esta toxina é produzida por uma série de patógenos associados às mucosas e foi sugerido seu papel imunomodulador, favorecendo a perpetuação da infecção pelas bactérias produtoras. **Objetivo:** o presente estudo visou contribuir no entendimento da atividade CDT como reguladora da resposta imune. Os objetivos específicos foram: determinar o efeito da toxina sobre a viabilidade e produção de NO, IL-10 e IL-12 por macrófagos ativados; e determinar a resposta imune humoral contra as subunidades CDT nos soros de indivíduos com diferentes condições periodontais e compará-la à resposta contra *A. actinomycetemcomitans* sorotipos a, b e c. **Métodos:** as proteínas recombinantes CDTA, CDTB e CDTC de *A. actinomycetemcomitans* foram expressas em *E. coli*, purificadas e o efeito da holotoxina sobre a viabilidade de células epiteliais CHO-9, epitelias gengivais OBA-9, macrófagos Raw 264.7 e macrófagos peritoneais foi determinado. A atividade imunomodulatória da CDT foi avaliada pela determinação da produção de óxido nítrico (NO), IL-10 e IL-12 em ensaios com macrófagos Raw 264.7 e macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ após ativação com LPS/ConA e IFN-γ. Os títulos de IgG sérica contra CDTA, CDTB e CDTC, e contra os sorotipos a, b e c de *A. actinomycetemcomitans* foram determinados nos soros de indivíduos com periodonto saudável (n=28), periodontite agressiva localizada (PAgL, n=24), periodontite agressiva generalizada (PAgG) (n=11) e periodontite crônica (PC) (n=17) através de ensaio de ELISA. Estes dados foram comparados com o nível de colonização por *A. actinomycetemcomitans* em indivíduos PAgG. A capacidade do soro inibir a atividade tóxica CDT foi determinada no soro de

indivíduos PAgG. **Resultados:** CDT foi capaz de inibir a proliferação de células epiteliais e macrófagos Raw 264.7. Porém, houve a manutenção da viabilidade de macrófagos Raw 264.7 e de células peritoneais de camundongos C3H/HePas, principalmente quando doses mais altas da holotoxina foram empregadas. CDT foi capaz de inibir a produção de NO de maneira dose dependente em macrófagos Raw 264.7 e em macrófagos peritoneais de camundongos (ANOVA-Tukey, $p<0,05$). Doses elevadas da CDT induziram a produção de IL-12 por macrófagos Raw 264.7 e por células peritoneais de camundongos primados com ConA após a adição de IFN-γ. A análise de resposta humoral contra *A. actinomycetemcomitans* revelou que 75% dos soros de indivíduos com PAgL e 81,8% dos PAgG responderam positivamente para a *A. actinomycetemcomitans*, sendo a resposta contra o sorotipo b mais frequente. Por outro lado, apenas 23,6% dos pacientes PC e 25% dos indivíduos periodontalmente saudáveis era soropositvos contra a bactéria. A resposta contra *A. actinomycetemcomitans* correlacionou-se com os níveis subgengivais da bactéria em indivíduos PAgG ($R= 0,75$, $p<0,05$). Os títulos de IgG contra CDTA e CDTB não diferiram entre os grupos. No entanto, títulos de IgG positivos para CDTC foram observados no soro de 100% dos indivíduos PAgG e em apenas 8,3% dos soros de indivíduos PAgL, em nenhum PC e em 25% dos saudáveis. Soros dos indivíduos PAgG foram capazes de neutralizar a atividade CDT em células CHO (72,7 -100%) em maior intensidade do que o soro de paciente controle com periodonto saudável sem resposta de IgG para CDT (61,2%). Os resultados sugerem que CDT de *A. actinomycetemcomitans* poderia participar da patogenia da periodontite por interferir na atividade microbicida de macrófagos pela inibição da produção de NO, porém induzindo a produção da citocina proinflamatória IL-12. A resposta contra CDTC é comumente encontrada no soro de indivíduos PAgG mas não no de PAgL. As diferenças na resposta a CDTC entre PAgG e PAgL pode indicar que CDT poderia ser expressa diferentemente pelas cepas infectantes. Alternativamente, a resposta de anticorpos contra CDTC poderia requerer a colonização em múltiplos sítios.

Palavras-chave: Toxina distensora citoletal. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Doença periodontal. Imunoglobulina G. Óxido nítrico.

ABSTRACT

ANDO, E.S. **Cytolethal Distending Toxin (CDT):** Analysis of humoral immune response in serum of patients presenting different periodontal conditions and its effects on macrophage activity. 2009. 114 p. Ph.D. Thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans is associated with the etiology of aggressive periodontitis and produces among other virulence factors the cytolethal distending toxin (CDT). CDT is capable to induce morphological alterations, cell cycle arrest in G2 phase and apoptosis in eukaryotic cells. This toxin is produced by several mucosa associated pathogens, and it was suggested its role as an immunomodulatory factor, leading to perpetuation of the infection by CDT producing bacteria. **Objectives:** The present study aimed to contribute on the understanding of CDT as an immune system regulatory factor. The specific objectives were: to determine the effect of the toxin in the viability and production of NO, IL-10 and IL-12 by activated macrophages; to determine the immune humoral response against CDT subunits in sera of subjects with different periodontal conditions and compare it with the response to *A. actinomycetemcomitans* serotypes a, b and c. **Methods:** Recombinant *A. actinomycetemcomitans* proteins CDTA, CDTB and CDTC were expressed in *E. coli*, purified and the effect of the holotoxin in cell viability of CHO-9 epithelial cells, OBA-9 gingival epithelial cells, Raw 264.7 macrophages and peritoneal macrophages was determined. The CDT immunomodulatory effect was evaluated by analysis of nitric oxide (NO), IL-10 and IL-12 production in Raw 264.7 cells and peritoneal macrophages from C3H/HePas and C3H/HeJ mice after stimulation with LPS/ConA and IFN-γ. Serum IgG titers against CDTA, CDTB and CDTC, and against *A. actinomycetemcomitans* serotypes a, b and c, through ELISA, were analyzed in sera of subjects with healthy periodontium (n=28), localized aggressive periodontitis (LAgP, n=24), aggressive generalized periodontitis (GAgP, n=11) and chronic periodontitis (CP, n=17). These data were compared with colonization levels of *A. actinomycetemcomitans* in GAgP subjects. The serum capacity to inhibit the CDT toxicity was determined in sera of GAgP subjects. **Results:** CDT was able to inhibit proliferation of epithelial cells and Raw 264.7 macrophages. However, cell viability was maintained in Raw 264.7 macrophages and in the peritoneal cells of C3H/HePas mice, mainly

when the highest doses of the holotoxin were used. Moreover, CDT induced inhibition of NO production in a dose dependent manner in Raw 264.7 macrophages, and mice's peritoneal macrophages (ANOVA-Tukey, $p<0.05$). Elevated doses of CDT led to IL-12 production by Raw264.7 and peritoneal macrophages from mice primed with ConA plus IFN-γ. The analysis of humoral response against *A. actinomycetemcomitans* revealed that 75% of serum from LAgP and 81.8% from GAgP subjects responded positively to *A. actinomycetemcomitans*, and response to serotype b was more prevalent. On the other hand, only 23.5% of CP patients and 25% of periodontally healthy subjects were sera positive against the bacteria. The response against *A. Actinomycetemcomitans* correlated with subgingival levels of the bacteria in GAgP subjects ($R=0.75$, $p<0.05$). The IgG titers against CDTA and CDTB did not differ among the groups. Positive IgG titers to CDTC was observed in 100% of sera from GAgP subjects and only 8.3% of LAgP subjects, none of CP and in 25% of periodontally healthy subjects. The sera of GAgP subjects were able to neutralize the CDT activity in CHO cells (range 72.7 – 100%) in a higher intensity than in the serum from a healthy control subject without IgG response to CDT (61.2%). The results suggested that the CDT of *A. actinomycetemcomitans* could participate in the pathogeny of the periodontitis by interfering in the antimicrobial activity of the macrophages by inhibition of NO production, although inducing the proinflamatory IL-12 cytokine synthesis. The response against CDTC was commonly found in the sera of GAgP subjects but not in the LAgP. The differences in the response to CDTC between GAgP and LAgP could indicate that CDT could be expressed differently by the infectant strains. Alternatively, the antibody response against CDTC could require the colonization of multiple sites.

Key words: Cytolethal distending toxin. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Periodontal disease. Immunoglobulin G. Nitric oxide.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-Confirmação da presença dos genes *cdtA* (A)e *cdtB* (B) nas recombinantes *E. coli* BL21(DE) pLYS pRSETacdtA e *E. coli* TOP10 pcdtBHis em gel de agarose a 1 %. 44

Figura 2-Gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE de alíquota das culturas de *E. coli* recombinante após a indução da expressão com IPTG por 4 horas de CDTA (A) e CDTB (B).. 45

Figura 3-Gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE das proteínas CDT recombinantes purificadas. Em A, CDTA, CDTB com a cauda de histidina. Em B, CDTB após a clivagem da cauda de histidina.. 45

Figura 4-Atividade CDT em células CHO-9 quando as subunidades foram misturadas, porém sem reconstituição. As células foram incubadas por 7 dias e as viáveis detectadas pela contagem das UFCs. Foram adicionadas 240 células/poço.. 47

Figura 5-Atividade CDT em células CHO-9 após reconstituição da holotoxina por 1 hora a 0 °C. As células foram incubadas por 7 dias e as viáveis detectadas pela contagem das UFCs.. 47

Figura 6-Atividade CDT em células OBA-9 após reconstituição da holotoxina por 1 hora a 0 °C. As células foram incubadas por 7 dias e as viáveis detectadas pela contagem das UFCs. 48

Figura 7-Atividade CDT em células Raw 264.7 após reconstituição da holotoxina por 1 hora a 0 °C. As células foram incubadas por 7 dias e as viáveis detectadas pela contagem das UFCs.. 49

Figura 8-Atividade CDT na produção de NO e na viabilidade celular de macrófagos Raw 264.7 ($2x10^5$ células/poço) ativados com LPS (500 ng/ml) e IFN-γ (2 µg/ml) quando adicionadas diferentes concentrações da CDT reconstituída (CDTA/CDTB/CDTC) e de suas subunidades, em µg/ml.. 51

Figura 9-Efeito da adição de diferentes concentrações da CDT reconstituída (CDTA/CDTB/CDTC) e de suas subunidades, em µg/ml, sobre a produção de NO (µM) (**A**) e sobre a viabilidade celular (**B**) detectada em ensaio de MTT (% de células viáveis) de macrófagos Raw 264.7 ($2x10^5$ células/poço). 52

Figura 10-Produção de IL-10 (**A**) e IL-12 (**B**) (pg/ml) por macrófagos Raw 264.7 ativados com LPS (500 ng/ml) e IFN-γ (2 µg/ml) após a adição de CDT reconstituída ou suas subunidades (µg/ml). 53

Figura 11-Produção de IL-10 (**A**) e IL-12 (**B**) (pg/ml) por macrófagos Raw 264.7 inoculados com a CDT reconstituída ou suas subunidades (µg/ml).. 54

Figura 12-Produção de NO (**A**) e viabilidade (**B**) de macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas (barras listradas) e C3H/HeJ (barras brancas) ativados

com LPS (500 ng/ml) e IFN-γ (2 µg/ml) adicionados de subunidades CDT ou de diferentes concentrações de CDT reconsitituída.. 56

Figura 13-Produção de NO (**A**) e viabilidade (**B**) dos macrófagos peritoneais não primados de camundongos C3H/HePas (barras listradas) e C3H/HeJ (barras brancas) após estímulo com ConA/ IFN-γ acrescidos de diferentes doses de CDT ou suas subunidades.. 58

Figura 14-Produção de NO e viabilidade dos macrófagos peritoneais de camundongos C3H/ HePas primados com ConA (20 µg) sem a adição de IFN-γ (**A** e **C**) e com IFN-γ (2 µg/ml) (**B** e **D**). 60

Figura 15-Produção de NO e viabilidade dos macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HeJ primados com ConA (20 µg) sem IFN-γ (**A** e **C**) e com IFN-γ (**B** e **D**) 61

Figura 16-Produção de NO e viabilidade dos macrófagos peritoneais de camundongos C3H/ HePas (**A** e **C**) e C3H/HeJ (**B** e **D**) primados com ConA (20 µg) acrescidos com IFN-γ após adição das subunidades CDT separadamente. ... 62

Figura 17-Produção de IL-10 (**A**) e IL-12 (**B**) pelos macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas (barras listradas) e C3H/HeJ (barras brancas) não primados após estímulo com ConA e IFN-γ acrescido de diferentes doses de CDT ou suas subunidades.. 64

Figura 18-Produção de IL-10 (barras listradas) e IL-12 (barras escuras) dos macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas primados com ConA (20 µg) sem adição de IFN-γ (**A** e **C**) e com IFN-γ (**B** e **D**).. 65

Figura 19-Produção de IL-10 (barras brancas) e IL-12 (barras escuras) dos macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HeJ primados com ConA (20 µg) sem IFN-γ (**A** e **C**) e com IFN-γ (**B** e **D**).. 66

Figura 20- Produção de IL-10 (barras brancas) e IL-12 (barras escuras) por macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HeJ (**A** e **C**) e C3H/HePas (**B** e **D**) primados com ConA (20 µg) acrescidos com IFN-γ após adição de subunidades CDT.. 67

Figura 21-Distribuição dos indivíduos reativos e não reativos e os níveis de IgG. para os sorotipos a (**A**), b (**B**) e c (**C**), separados em grupos de diferentes condições periodontais (Saudáveis, PAgL, PAgG e PC)..... 70

Figura 22-Distribuição dos indivíduos reativos e não reativos e os níveis de IgG. para a CDTA (**A**), CDTB (**B**) e CDTC (**C**), separados em grupos de diferentes condições periodontais (Saudáveis, PAgL, PAgG e PC). 73

LISTA de ABREVIATURAS e SIGLAS

µg – micrograma

µl – microlitros

*Aa*CDT – toxina distensora citoletal do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

BSA – soro albumina bovina

CDT – toxina distensora citoletal

células CHO-9 – células de ovário de hamster chinês 9

células KB – células de carcinoma bucal

cNOs – óxido nítrico sintase contitutivo

CO_2 – dióxido de carbono

ConA – concanavalina A

D.O. – densidade óptica

DMEM – meio de cultura modificado por Dulbecco

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – desoxirribonucleotídeos trifosfato

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF – fator de crescimento epidérmico

ELISA – ensaio imunoenzimático

FGF – fator de crescimento do fibroblasto

g – gravidade

IFN – interferon

Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

iNOs – óxido nítrico sintase induzível

kDa- kilodalton

LB – Luria Bertani

LPS – lipopolissacarídeo

M – molar

mg – miligrama

min – minuto

ml – mililitros

mm – milímetros

mM – milimolar

MTT – 3-{4,5-dimetiltiazol -1il}-2,5-difenil brometo de tetrazólio

N – normalidade

n – número

NF-κB – fator nuclear κB

ng – nanograma

nm – nanômetro

NO – óxido nítrico

OMP – proteína de membrana externa

PAgG – periodontite agressiva generalizada

PAgL – periodontite agressiva localizada

pb – pares de base

PB – profundidade de bolsa

PBS – solução salina tamponada fosfatada

PC – periodontite crônica

PCR – reação de polimerase em cadeia

pH – potencial hidrogeniônico

PM – peso molecular

PMN – polimorfonucleares

pmoles – picomoles

rpm – rotações por minuto

s- segundos

SDS – dodecil sulfato de sódio

TLR – receptor *toll- like*

TNF – fator de necrose tumoral

TSBYE – meio triptone soja acrescido de extrato de levedura

U – unidades

UV – ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22

2 OBJETIVOS 29

3 MATERIAL E MÉTODOS 30
3.1 Delineamento do estudo 30
3.2 Obtenção das *E. coli* recombinantes em *cdtA* e *cdtB* 31
3.2.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes CDTA e CDTB 32
3.3 Fase 1 - Determinação da atividade CDT com a toxina reconstituída 33
3.3.1 Cultivo celular 34
3.3.2 Teste da atividade tóxica 35
3.3.3 Determinação da produção de nitrito por macrófagos Raw 264.7 ... 35
3.3.4 Determinação da produção de nitrito em células peritoneais de camundongos 36
3.3.5 Teste de viabilidade celular com MTT após análise da produção de NO 37
3.3.6 Análise da produção de citocinas 38
3.3.7 Análise estatística 38
3.4 Fase 2- Determinação dos títulos séricos de IgG contra CDTA, CDTB, CDTC e de *A. actinomycetemcomitans* sorotipos a, b e c 39
3.4.1 População estudada e amostras de soro 39
3.4.2 Determinação dos níveis séricos de IgG contra *A. actinomycetemcomitans* sorotipos a, b e c. 40
3.4.3 Purificação das proteínas CDTA, CDTB e CDTC 41
3.4.4 Determinação dos níveis séricos de IgG contra CDTA, CDTB e CDTC 41
3.4.5 Atividade neutralizadora do soro contra a CDT 41
3.4.6 Análise dos resultados 42

4 RESULTADOS 44
4.1 Obtenção e purificação das proteínas CDTA, CDTB e CDTC 44
4.2 Fase 1-Verificação da atividade CDT em células epiteliais e macrofágicas 46
4.2.2 Determinação da produção de NO, IL-10 e IL-12 por macrófagos Raw 264.7 49
4.2.3 Determinação da produção de NO, IL-10 e IL-12 por macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ 55
4.3 Fase 2- Determinação dos títulos séricos de IgG contra os sorotipos a, b e c de *A. actinomycetemcomitans* e as subunidades CDTA, CDTB e CDTC 68
4.3.1 Detecção de IgG contra os sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* . 68
4.3.2 Detecção de IgG contra CDTA, CDTB e CDTC 71
4.3.3 Correlação entre os níveis de IgG contra os sorotipos de *A. actinomycetemcomitans*, contra as subunidades CDT e contra OMP29 e OMP100 74
4.3.4 Análise dos dados obtidos pela contagem de *A. actinomycetemcomitans* dos indivíduos com diagnóstico PAgG 74

4.3.5 Atividade neutralizadora do soro 75

5 DISCUSSÃO 77

REFERÊNCIAS 95

ANEXOS 109
Anexo A- Soros de pacientes utilizados, diagnóstico da saúde periodontal, idade, gênero e raça. 109
Anexo B- Níveis de IgG séricos reativos aos diferentes sorotipos de *A. actinomycetemcomitans*, obtidos da reação de ELISA com diluição do soro de 1:20,000. 111
Anexo C- Níveis de IgG séricos reativos às subunidades CDTA, CDTB e CDTC, obtidos da reação de ELISA com diluição do soro de 1:150 de pacientes com diferentes condições peridodontais. 113

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória que leva à destruição dos tecidos de suporte dos dentes decorrente da interação entre bactérias que colonizam os sítios subgengivais e o hospedeiro. A destruição do ligamento periodontal, reabsorção do osso alveolar e migração apical do epitélio do sulco resultam na formação de bolsas periodontais e podem levar à perda do elemento dental. Além disso, as periodontites foram associadas a doenças sistêmicas como: doenças cardiovasculares, diabetes e nascimento de crianças de baixo peso (BECK et al., 1999; LÓPEZ et al., 2002; MEALEY e ROSE, 2008).

Em 1999, a Academia Americana de Periodontia reclassificou as periodontites, baseada na velocidade de progressão da perda de inserção, em: periodontite crônica – PC (anteriormente denominada periodontite do adulto) e periodontite agressiva (anteriormente denominada: periodontite juvenil localizada, de estabelecimento precoce e de rápida progressão). A periodontite agressiva pode ser de forma localizada – PAgL ou generalizada – PAgG, fundamentada na extensão e acometimento da infecção (ARMITAGE, 1999).

Entre as principais bactérias associadas à etiologia da periodontite, principalmente da forma agressiva localizada e de alguns casos de agressiva generalizada, está o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ZAMBON, 1985; SLOTS e LISTEGARTEN, 1988; TAKAHASHI et al., 2001). Sugere-se que fatores inerentes ao hospedeiro também poderiam influenciar no estabelecimento e progressão da doença, representados por diferenças na resposta imune contra o patógeno (SCHENKEIN, 2007; DIEHL et al., 2003).

A. actinomycetemcomitans, anteriormente classificado no gênero *Actinobacillus*, juntamente com *Aggregatibacter aphrophilus* e *Aggregatibacter segnis*, passou a integrar o novo gênero *Agreggatibacter*, fundamentados em estudos de homologia de DNA e análise filogenética de genes de manutenção (NØRSKOV-LAURITSEN e KILIAN, 2006).

A. actinomycetemcomitans é um microrganismo gram-negativo, capnofílico, sacarolítico, imóvel, anaeróbio facultativo e pode ser classificado em 6 sorotipos (a-f), sendo os sorotipos a, b e c os mais prevalentes entre isolados clínicos orais (SLOTS et al., 1982; ZAMBON et al., 1990; OLSEN et al., 1999; KAPLAN et

al., 2002; ASIKAINEN et al., 1991; TEIXEIRA et al., 2006). O sorotipo b é usualmente associado à periodontite agressiva (ZAMBON et al., 1983; ASIKAINEN et al., 1991; TINOCO et al., 1997), embora o sorotipo c tenha sido mais frequentemente detectado em indivíduos com periodontite em certas populações, inclusive no Brasil; já o sorotipo a está associado a indivíduos periodontalmente saudáveis (YANG et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2006; KAWAMOTO, 2005).

A resposta do hospedeiro contra *A. actinomycetemcomitans* em casos de doença periodontal, caracteriza-se pela produção de citocinas proinflamatórias como a interleucina 1-β (IL-1β) e IL-8 pelas células epiteliais gengivais (LAUBE et al., 2008; UCHIDA et al.,2001). Esta resposta resulta na quimiotaxia e ativação de neutrófilos, embora seja controversa na proteção ou progressão da doença (RESTAINO et al., 2007; SHIBATA et al., 2001). Com a continuada presença da bactéria, os macrófagos e linfócitos se tornariam as células dominantes no infiltrado inflamatório. Com a presença de linfócitos, foram detectados altos níveis de interferon-γ (IFN-γ) produzido pelas células Th1 em tecidos periodontais afetados e estes títulos estão associados à progressão da lesão e à maior severidade da doença (GARLET et al., 2003; HONDA et al., 2006).

Com a ativação de linfócitos T, levaria a consequente produção de anticorpos pela ativação dos linfócitos B. A imunoglobulina G (IgG) é o anticorpo predominante no soro de pacientes com periodontite agressiva, sendo a subclasse IgG2 a mais abundante em casos de PAgL (SCHENKEIN et al., 2007). O papel protetor dos anticorpos na doença peridontal acometida pela *A. actinomycetemcomitans*, ainda continua controverso. No soro de pacientes com PAgL foi demonstrada a capacidade neutralizadora da atividade da leucotoxina por IgG (TSAI et al., 1981; LALLY et al., 1996; BUENO et al., 1998; ENGSTRÖM et al., 1999). Além disso, a IgG2 sinergicamente com a IgG1, opsonizada com antígenos de *A. actinomycetemcomitans*, induz à morte da bactéria por neutrófilos (WILSON et al., 1995; WILSON e HAMILTON, 1995). Por outro lado, o papel protetor dos anticorpos é questionável, uma vez que alguns estudos o associam à restrição da doença de maneira localizada, enquanto outros estudos discutem o efeito não discernível na periodontite (KINANE et al., 1999; ALBANDAR et al., 2001).

Um patógeno periodontal deve apresentar propriedades que permitam a colonização do periodonto, a evasão das defesas do hospedeiro e a indução de dano tecidual (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 1991). Em *A. actinomycetemcomitans* destacam-se as adesinas fimbriais e não fimbriais que são capazes de interagir e aderir a receptores salivares na superfície dos dentes, proteínas da matriz extracelular, células epiteliais e outras bactérias (MEYER e FIVES-TAYLOR, 1994; ROSEN et al., 2003; ASAKAWA et al., 2003). O lipopolissacarídeo (LPS) pode induzir a reabsorção óssea *in vitro* (ISHIHARA et al., 1991) e *in vivo* (NISHIDA et al., 2001) e afetar a produção de colágeno (TAKAHASHI et al., 2008). Produz também a leucotoxina que age sobre as células polimorfonucleares (PMN), induzindo apoptose celular e imunossupressão (BAEHNI et al., 1981; KOROSTOFF et al., 2000).

A OMP29 de *A. actinomycetemcomitans*, uma proteína de membrana externa, é o principal antígeno reconhecido por IgG no soro de pacientes com periodontite agressiva (WILSON, 1991). Outra proteína de envelope externo, OMP100 também reconhecida no soro de pacientes, tem papel na aderência e invasão bacteriana em queratinócitos humanos e indução de citocinas pró-inflamatórias (ASAKAWA et al., 2003). Soros de pacientes com PAgL e PAgG exibem maiores títulos de anticorpos IgG contra OMP100 e OMP29 de *A. actinomycetemcomitans* do que o soro de pacientes com outras condições periodontais (BRUNHEIRA, 2007).

A. actinomycetemcomitans produz uma citotoxina, denominada toxina distensora citoletal (CDT), capaz de induzir apoptose, distensão celular, bloqueio do ciclo celular na fase G2 ou G1 da mitose e fragmentação da cromatina de células alvo (SUGAI et al. 1998; MAYER et al. 1999; SHENKER et al., 1999; AHMED et al., 2001). A CDT de *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*CDT) é capaz de agir sobre células epiteliais de carcinoma cervical (HeLa), de ovário de hamster chinês (CHO) e de carcinoma bucal (KB) (DiRIENZO et al., 2002), linfócitos T (SHENKER et al., 2004), fibroblastos murinos (FERNANDES et al., 2008), fibroblastos gengivais e periodontais (BELIBASAKIS et al., 2002).

A. actinomycetemcomitans é o único organismo da cavidade bucal reconhecido pela produção de CDT, mas a toxina é produzida por outros patógenos gram-negativos associados a mucosas como: *Shigella dysenteriae, Shigella boydii, Escherichia coli* isoladas de pacientes com diarréia (JOHNSON

e LIOR, 1987, 1988a), *Helicobacter hepaticus, Helicobacter bilis, Helicobacter canis* (CHIEN et al. 2000; YOUNG et al., 2000a), *Helicobacter pullorum* (YOUNG et al., 2000b), *Haemophilus ducreyi, Campylobacter jejuni* (COMAYRAS et al., 1997; JOHNSON e LIOR, 1988b), *Campylobacter coli, Campylobacter fectus* (ASAKURA et al., 2007) e *Salmonella enterica* (Typhi) (HAGHJOO e GALAN, 2004). Em todos os organismos produtores, exceto em *Salmonella enterica* (Typhi) (PARKHILL et al., 2001), a CDT é codificada por três genes adjacentes *cdta, cdtb* e *cdtc* em um único operon (SCOTT e KAPER, 1994; GELFANOVA *e*t al., 1999). Em *A. actinomycetemcomitans*, estes genes apresentam homologia de aproximadamente 90% com genes que codificam a CDT em *H. ducreyi* e formam as proteínas CDTA, CDTB e CDTC com pesos moleculares de aproximadamente 24, 31 e 20 kDa, respectivamente (MAYER et al., 1999).

CDTB é a parte ativa da toxina que apresenta homologia funcional e estrutural com *DNase*I de mamíferos, causando a fragmentação da cromatina de células eucariontes e consequente parada do ciclo celular (LARA-TEJERO e GALÁN, 2000; PURDY et al., 2000; ELWEEL et al., 2000; NESIC et al., 2004). Outros estudos demonstraram que a CDTB age como uma fosfatase, levando a ativação da cascata de checagem do ciclo celular, prevenindo a replicação (ESCALAS et al., 2000; SHENKER et al., 2007).

CDTA e CDTC interagem com a célula alvo, participando na ligação da toxina com a célula hospedeira e no transporte da CDTB para o interior da célula (LEE et al., 2003; DENG e HANSEN, 2003). A atividade distensora da CDT foi baixa quando somente as proteínas recombinantes CDTB e CDTC foram adicionadas e a ação foi totalmente reconstituída quando se adicionou CDTA, indicando que esta fração, provavelmente, modifica ou altera uma ou ambas as frações da toxina para formar o complexo CDT ativo (DENG et al., 2001; FRISK et al., 2001).

Embora a associação da CDT com a patogênese ainda não seja totalmente esclarecida, esta toxina pode representar uma adaptação bacteriana, que poderia afetar a interação do microrganismo com o sistema imune do hospedeiro.

Experimentos realizados em camundongos utilizando mutante de *H. hepaticus* deficiente no gene *cdt* produziu uma resposta de IgG2 muito baixa e não houve a produção de uma resposta IgG1 significante (PURDY et al., 2000).

Além disso, tanto em modelo animal, como em voluntários humanos, um mutante de *H. ducreyi* deficiente em CDT induziu lesões de cancro de maneira semelhante às cepas selvagem (LEWIS et al., 2001). Entretanto, o *C. jejuni* deficiente no gene *cdtB* foi menos invasivo em tecidos de camundongo (FOX et al., 2004), levando a um efeito inflamatório atenuado no animal quando comparada com a cepa selvagem (PURDY et al., 2000).

A *Aa*CDT provoca parada do ciclo celular na fase G2 e apoptose em linfócitos T Jurkat, células dendríticas e células monocíticas (SHENKER et al., 2005; WISING et al., 2005; SMITH e BAYLES, 2006; RABIN et al., 2009). A atividade CDT sobre monócitos foi demonstrada pela diminuição da atividade metabólica, ocasionando morte destas células após 48 horas. Diferindo da leucotoxina, a CDT não exerceu efeito sobre leucócitos PMNs não alterando a sua capacidade fagocítica (SVENSSON et al., 2001).

A resposta de anticorpos contra CDT foi analisada por Mbwana et al. (2003). Através de ensaio imunoenzimático (ELISA), estes autores demonstraram que entre 50 soros de pacientes adultos com periodontite e que apresentaram *A. actinomycetemcomitans* cultiváveis, 10 (20%) apresentaram altos níveis de IgG contra a holotoxina CDT de *H. ducreyi* e 28 (56%) apresentaram níveis baixos de anticorpos. Em estudo recente foi verificado que apenas 12,5 % dos pacientes com PAgL apresentaram reatividade para a toxina de *A. actinomycetemcomitans* (XYNOLAGA et al., 2009).

Apesar da sua atividade citotóxica sobre uma ampla gama de células eucariontes, o papel da CDT na patogenia das doenças periodontais ainda não foi completamente elucidado. *Aa*CDT induz a produção de IL-6 por fibroblastos gengivais e também a expressão do receptor ativado do ligante NF-κB (RANKL), denominado fator de diferenciação de osteoclastos, envolvido na reabsorção óssea (BELIBASAKIS et al., 2005a, b). Foi observado também que *Aa*CDT estimula a síntese das citocinas proinflamatórias IL-1β, IL-6 e IL-8 por monócitos humanos (AKIFUSA et al., 2001). Porém pouco se sabe sobre a atividade da CDT sobre as células fagocíticas.

Os macrófagos são amplamente distribuídos e têm papel indispensável na homeostase e defesa, contribuindo para o equilíbrio entre a presença de antígenos e a sua remoção através da fagocitose (GORDON, 2003). A ativação dos macrófagos pode ser proinflamatória ou anti-inflamatória, contribuindo com

a destruição ou com a regeneração tecidual. A sua ativação e polarização podem ocorrer tanto pelos microrganismos assim como seus componentes, como o LPS, através de receptores *Toll-like* (TLR), ou através da secreção de citocinas pelas células (FUJIHARA et al., 2003, MARTINEZ et al., 2008). Os macrófagos polarizados podem ser classificados em dois grandes grupos: M1 ou macrófagos classicamente ativados, que são obtidos pela ativação com LPS, derivado de bactérias gram-negativas, associado ou não ao IFN-γ; e macrófagos alternativamente ativados ou M2, que podem ser subdivididos em M2a (após exposição a IL-4 ou IL-13, M2b (após exposição a complexos imunes em combinação com IL-1ß ou LPS) e M2c (IL-10, TGFß ou corticóides) (MARTINEZ et al., 2008).

As células macrofágicas M1 secretam quantidades significantes de citocinas proinflamatórias como IL-1ß, IL-15, IL-18, TNFα, e IL-12, enquanto os macrófagos M2 participam da resolução da inflamação pela menor secreção de citocinas proinflamatórias. M1 também diferem de M2 por apresentarem expressão elevada de MHC-II, CD80 e CD86, e baixa de MRC1 ou Fcγ RII (BOEHM et al., 1997). Funcionalmente, as células M1 são caracterizadas pelo aumento na fagocitose e maior capacidade de eliminar patógenos intracelulares (EZEKOWITZ e GORDON, 1984; MOSSER e HANDMAN, 1992). Esta maior atividade microbicida é mediada por diferentes mecanismos que incluem a restrição de ferro e de outros nutrientes para os microrganismos, acidificação do fagossomo, síntese de ROI (GRUENHEID e GROS, 2000; CARLIN et al, 1989) e produção de óxido nítrico (NO) (MACMICKING et al., 1997). Um dos muitos fatores relatados na resposta imune contra os microrganismos é a produção de óxido nítrico (NO), principalmente pelos macrófagos. A síntese de NO é envolvida no controle de doenças infecciosas, processos autoimunes e doenças degenerativas crônicas.

NO é um gás volátil, solúvel em lipídeos e em água, sintetizado a partir do aminoácido L-arginina pela enzima NO sintase (NOS) (GREEN et al., 1981). Existem três tipos de NO sintase, sendo duas constitutivas (cNOS) que sintetizam NO por períodos curtos e uma induzida (iNOS) que sintetiza NO após ativação de células como macrófagos, linfócitos T e B (SHERMAN et al., 1993; JORENS et al., 1992; BOGDAN et al., 2000). A expressão da iNOS é induzida pela ligação de agentes indutores como IFN-γ, TNF-α e LPS em receptores na

membrana celular. IFN-γ parece ser o mais importante agente estimulador da produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos pela via NF-κB (STUEHR e MARLETTA et al.; 1987; JORENS et al., 1992; KENDALL et al., 2001).

Em relação às doenças periodontais, estudos demonstram que há uma maior detecção de iNOS em tecidos gengivais acometidos pela doença do que em tecidos saudáveis (LAPPIN et al., 2000). Entretanto, sua função na doença periodontal ainda é desconhecida, uma vez que apesar de detectado em tecidos gengivais, el não se correlacionou com a capacidade de quimiotaxia de neutrófilos (SHIBATA et al., 2002).

Fernandes et al. (2008) utilizando o sobrenadante do lisado de *E. coli*, que alberga o plasmídeo recombinante pCDT1 que codifica os genes *cdt* de *A. actinomycetemcomitans*, verificaram que a *Aa*CDT foi capaz de induzir a inibição da produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongo. Este efeito foi observado também em macrófagos de camundongos nocaute de IL-4 ou IL-10, sugerindo que estas citocinas não participavam da inibição mediada pela CDT. Os resultados sugerem que esta inibição poderia ser causada pelo bloqueio da via de ativação da iNOS pelo IFN-γ. Se este fato ocorrer *in vivo*, poderia ser um fator de perpetuação da doença periodontal, uma vez que o NO está envolvido no controle de doenças infecciosas. Para esclarecer o papel da *Aa*CDT neste processo, há a necessidade do uso de *Aa*CDT purificada e de suas subunidades nos experimentos de inibição da produção de NO por macrófagos ativados.

2 OBJETIVOS

Baseado no exposto, nos propusemos a:

- Construir bactérias recombinantes contendo os genes da CDTA e CDTB de *A. actinomycetemcomitans*.

- Avaliar o efeito das frações da CDT separadamente e combinadas sobre a proliferação de células epiteliais gengivais.

- Determinar o efeito de CDT sobre a produção de NO e de citocinas IL-10 e IL-12 por macrófagos ativados de linhagem e peritoneais.

- Determinar a resposta imune humoral contra as proteínas CDTA, CDTB e CDTC no soro de indivíduos com diferentes condições periodontais e correlacionar estes dados com os níveis de infecção pela bactéria.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Neste estudo foram obtidas *E. coli* recombinantes em *cdtA* e *cdtB* para posterior purificação das proteínas CDTA e CDTB, respectivamente, as quais foram utilizadas em ensaios de ELISA para detecção de títulos de IgG, juntamente com a proteína CDTC. As subunidades CDTA, CDTB e CDTC utilizadas em estudos com células foram purificadas a partir de *E. coli* recombinantes que foram gentilmente cedidas pelo Professor Doutor Joseph DiRienzo, da Universidade da Pensilvânia, EUA, durante estágio realizado em seu laboratório.

Na primeira parte dos experimentos foi analisado o efeito da CDT e suas subunidades sobre a viabilidade em células CHO-9, epitelial gengival OBA-9 e por macrófagos. Foram verificados também a produção de óxido nítrico (NO), IL-10 e IL-12 em macrófagos Raw 264.7 ativados com LPS/ IFN-γ e macrófagos peritoneais de camundongos ativados com LPS ou Concanavalina A (ConA). Foram empregadas células de animais da linhagem selvagem C3H/HePas e de animais deficiente nos receptores *toll-like 4* (TLR4) C3H/HeJ.

A segunda parte do estudo teve como objetivo analisar os títulos de imunoglobulina G (IgG) sérica contra as subunidades CDT purificadas e a bactéria total (sorotipo a, b e c) utilizando soro de indivíduos com diferentes condições periodontais. Além disso, os títulos séricos de IgG contra as subunidades CDT foram comparados com os obtidos para proteínas de membrana externa OMP100 e OMP29, os quais estão presentes na *A. actinomycetemcomitans* (BRUNHEIRA, 2006) e com os níveis subgengivais da bactéria determinados por análise semiquantitativa de *checkerboard* em pacientes com PAgG (FAVERI et al., 2008).

3.2 Obtenção das *E. coli* recombinantes em *cdtA* e *cdtB*

Os fragmentos de DNA codificando *cdtA* e *cdtB* foram obtidos por amplificação utilizando iniciadores contendo os sítios de restrição *Sac*I e *Xho*I, e *Sac*I e *Pst*I, respectivamente (Tabela 1). Como DNA molde foi utilizado o plasmídeo recombinante pCDT1, inserido em *E. coli* DH5α, que possui as ORFs *cdtABC* da cepa *A. actinomycetemcomitans* FDCY4 (Genebank número AF006830). As reações de amplificação foram compostas de 80 ng de DNA plasmidial, 50 pmoles de cada oligonucleotídeo (IDT Instrucom, Coralville, IA, EUA), 5 µl de 10x tampão contendo 1,5 mM Mg^{+2} (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 100 mM dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 2,5 U Taq polimerase (Invitrogen, Brasil) em um volume final de 50 µl. As reações foram realizadas em termociclador (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400, Walthan, MA, EUA), compreendendo de desnaturação inicial de 94 °C/1min, seguindo-se de 30 ciclos de 94 °C/1min, 54 °C/1min, 74 °C/45s e extensão final de 74 °C/5min.

O amplicom *cdtA* foi digerido com *Sac*I e *Xho*I (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) e ligado a pRSET (Invitrogen cat n.V351-20). O amplicom *cdtB* foi digerido com *Sac*I e *Pst*I (New England Biolabs) e ligado a pTHIOHis do sistema His-Patch ThioFusion Expression System (Invitrogen cat n. K360-01), utilizando ligase (Invitrogen).

Tabela 1- Oligonucleotídeos para amplificação dos genes *cdt* e tamanho dos produtos da reação.

Amplicon (pb)	Oligonucleotídeo	Sequência
cdta (709)	CDTA1-SacI	5' GATGGAGCTCAGGAGAGGTACAATGA 3'
	CDTA2-XhoI	5' TCACTGCAGTCTCCTTAGCGATCATGA 3'
cdtb (880)	CDTB1-SacI	5'GCTAAGGAGCTCATATGCAATGGGTAAAGC3'
	CDTB2-PstI	5' TCACTGCAGTCTCCTTAGCGATCATGA 3'

Sublinhado: sítio *Sac*I em CDTA1-SacI e *Xho*I, em CDTA2-*Xho*I; sítio *Sac*I em CDTB1-SacI e *Pst*I em CDTB2-PstI.

Os produtos da ligação foram transformados em *E. coli* BL21 (DE) pLys para a CDTA e *E. coli* TOP10 para a CDTB por eletroporação (Micro Pulser BioRad, Hercules, CA, EUA) conforme as instruções do fabricante. Alíquotas foram inoculadas em ágar Luria-Bertani (LB) acrescido de 50 µg/ml de

ampicilina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e 35 µl de cloranfenicol (Sigma-Aldrich), para a obtenção da recombinante de CDTA e 100 µg/ml de ampicilina para CDTB, e incubadas em estufa a 37 ^{o}C. As colônias transformantes foram subcultivadas para novo meio e submetidas à extração plasmidial (Perfectprep Plasmid Mini, Eppendorf, Westbury, NY, EUA). Para confirmação da presença dos genes *cdt* nas transformações, os plasmídios resultantes foram digeridos com as enzimas de restrição *Sac*I e *Xho*I (*cdtA*) e *Sac*I e *Pst*I (*cdtB*), os produtos submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose a 1% e visualizados sob luz UV após coloração com brometo de etídeo (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich). E também foi realizada reação de sequenciamento parcial no Instituto de Ciências Biomédicas II, Laboratório de Reparo de DNA. Após a determinação da identidade das amostras recombinantes para cada gene *cdt*, foram denominadas *E. coli* BL21(DE) pLYS pRSETacdtA para a CDTA e *E. coli* TOP10 pcdtBHis para a CDTB.

3.2.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes CDTA e CDTB

Parar verificar qual tempo ideal de crescimento bacteriano seria necessário para a produção das proteínas recombinantes, inicialmente, foi realizada expressão piloto em que foi analisada a indução da produção das CDTs entre o período de 1 a 4 horas, assim como recomendado pelo fabricante (Invitrogen, EUA). O peso molecular esperado para cada proteína recombinante é de 27 kDa para a CDTA e 43 kDa para a CDTB.

Uma vez verificado o tempo de crescimento, uma única colônia de *E. coli* BL21(DE) pLYS pRSETacdtA e *E. coli* TOP10 pcdtBHis foi inoculada em caldo LB acrescido dos respectivos antibióticos e deixada sob agitação a 120 rpm por 16 horas a 37 °C. As culturas foram adicionadas em novo caldo LB, agitadas a 30 °C para a CDTA e 37 °C para a CDTB até que atingissem a densidade óptica de 0,5 a um comprimento de onda de 600 mn ($D.O_{600nm}$= 0,5). A expressão de cada subunidade CDT foi induzida pela adição de isopropil β-D-tiogalactoside (IPTG- Sigma-Aldrich) a uma concentração final de 1 mM, seguindo-se incubação sob agitação a 250 rpm por 4 horas e então o precipitado armazenado a -20 °C.

Para a purificação da CDTA e CDTB contendo a cauda de histidina, as células de *E. coli* foram ressuspensas em 5 mM tampão imidazol e submetidas a lise por sonicação (Ultrasonic Processor VCX 130PB, Sonics e Materials Inc, Newton, CT, EUA) por 4 vezes com ciclos de 1 minuto cada e intervalos de 2 minutos em potência máxima. A expressão do gene alvo foi analisada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 10% assim como descrito por Laemmli (1970) e este corado pelo método de Comassie Blue (Bio-Rad). As proteínas detectadas no sobrenadante foram purificadas através de cromatografia de afinidade utilizando resina níquel quelante conforme as instruções do fabricante (Ni-NDA, Invitrogen). A verificação da presença das CDTs foi realizada a partir da detecção da cauda de histidina fusionada à proteína.

Como CDTB continha um sítio de clivagem de enteroquinase, a cauda de histidina foi removida após digestão de 20 ng de CDTB com 1 U de enteroquinase por 16 horas a 4 °C, seguindo-se purificação em coluna de resina (EK-Away, Invitrogen). Após clivagem o tamanho aproximado para a CDTB é de 31 kDa.

A CDTB foi concentrada utilizando membrana filtrante com poro para proteínas de peso molecular superior a 30 kDa (Amicon Ultra, Millipore, Irlanda).

A CDTC foi obtida a partir de cultura da cepa de *E. coli* BL21(DE) pET15bcdtc recombinante e purificada conforme descrito no item 3.3. As concentrações de CDTA, CDTB e CDTC foram mensuradas através do método de Bradford (1976).

3.3 Fase 1 - Determinação da atividade CDT com a toxina reconstituída

Com o intuito de verificar a atividade da toxina reconstituída em células eucarióticas, foram realizados testes de viabilidade (células epiteliais e macrofágicas), de produção de NO e de citocinas em células macrofágicas. A CDTA, CDTB e CDTC, para a realização destes experimentos, foram obtidas a partir de recombinantes de *E. coli* BL21(DE) pET15bcdtA, *E. coli* BL21(DE) pET15bcdtB e *E. coli* BL21(DE) pET15bcdtc, respectivamente, e a purificação foi feita conforme Mao e Dirienzo (2002). Foram utilizadas estas recombinantes

para a obtenção das proteínas, pois as obtidas no item 3.2.1 não expressaram níveis suficientes da CDTA e CDTB para a utilização neste experimento. Brevemente, uma única colônia de *E. coli* recombinante foi inoculada em 10 ml de caldo LB acrescido de 100 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich) e incubada a 37 °C por 16 horas. Em seguida, as culturas foram adicionadas a 500 ml de caldo LB e mantidas sob agitação a 250 rpm, a 37 °C, até que atingissem uma $D.O._{600nm}$ de 0,8. Foi acrescentado IPTG (Sigma-Aldrich) a uma concentração final de 1 mM, seguindo-se incubação sob agitação a 250 rpm por 5 horas e então o precipitado foi armazenado a -20 °C. As proteínas foram lisadas em tampão contendo 6 M de uréia (Invitrogen) e purificadas através de cromatografia de afinidade utilizando resina níquel quelante e em seguida dialisadas em tampões com quantidade decrescente de uréia. As proteínas purificadas apresentaram o tamanho aproximado de 27 kDa para CDTA, 34 kDa para CDTB e 23 kDa para a CDTC.

3.3.1 Cultivo celular

Para o experimento, foram utilizadas células CHO-9, células epiteliais gengivais OBA-9 e macrófagos Raw 264.7.

Células CHO-9, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck, Departamento de Microbiologia (ICB-USP), e os macrófagos murínicos Raw 264.7, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Toshihisa Kawai, Forsyth Institute, Boston, EUA, foram cultivadas e mantidas em meio DMEM (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica: 10.000 U/ml de penicilina G (ICN Biomedicals, Aurora, OH, EUA) e 100 U/ml de sulfato de estreptomicina (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha). As células imortalizadas provindas de tecido epitelial gengival, denominadas células OBA-9, foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Shinya Murakami da Universidade de Osaka, Japão. Estas foram mantidas em meio queratinócito livre de soro (Invitrogen), suplementado com insulina, EGF e FGF (de acordo com o fabricante, Invitrogen) e 100 U/ml de penicilina /estreptomicina (100 µg/ml) (COSTEA et al., 2005).

Todas as células foram mantidas em estufa contendo 5% de CO_2 a 37 °C (Shel Lab) e para os experimentos a contagem foi realizada com corante vital azul de tripan (0,4%) em câmara de Newbauer.

3.3.2 Teste da atividade tóxica

Inicialmente, as frações purificadas da toxina CDT foram descongeladas em gelo e misturadas em diferentes proporções (1- 30 µg de CDTA, 10 µg de CDTB e 30 µg de CDTC/poço; 2- 15 µg de CDTA, 10 µg de CDTB e 15 µg CDTC/poço), segundo Mao e Dirienzo (2002). Foram realizados dois ensaios com as células CHO-9: no primeiro, as soluções de toxina foram adicionadas às células eucarióticas imediatamente após a realização da mistura, enquanto no segundo ensaio, as misturas foram deixadas sob agitação a 0 °C por 1 hora para a reconstituição da toxina. Foram também utilizadas as subunidades separadamente nas seguintes quantidades: 30 µg de CDTA, 10 µg de CDTB e 30 µg de CDTC por poço.

Foram adicionadas 240 células/poço em 1 ml de meio de cultura em placas de cultura de tecidos de 6 poços (Corning - Costar). As subunidades da CDT separadas e as misturas foram adicionadas a cada poço, em triplicata e em seguida foram adicionados 2 ml de meio de cultura. Após a incubação em estufa com 5% de CO_2 a 37 °C (Shel Lab) por 7 dias, as células foram fixadas com 10% formaldeído e coradas com 1% cristal violeta. Foi realizada a contagem das colônias formadas e os dados analisados em UFC (unidades formadoras de colônia) (MAO e DIRIENZO, 2002). O experimento com a toxina reconstituída foi realizada também com as células OBA-9 e Raw 264.7.

3.3.3 Determinação da produção de nitrito por macrófagos Raw 264.7

A toxina foi reconstituída em diferentes concentrações e diluída seriadamente a partir de 30 µg/ml de cada subunidade (CDTA, CDTB e CDTC). As soluções foram deixadas sob agitação a 0 °C por 1 hora para a reconstituição da toxina. Foram utilizadas as subunidades separadamente em concentração de 30 µg/ml por poço.

As células Raw 264.7 ($2x10^5$ células/poço) foram adicionadas em placas de cultura de 96 poços (Corning–Costar). Em seguida, foi adicionado lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* sorotipo O111:B4 (Sigma-Aldrich) em concentração final de 500 ng/ml e IFN-γ a uma concentração de 2 µg/ml (Sigma-Aldrich). As toxinas reconstituídas e as subunidades foram adicionadas a cada poço e as placas incubadas a 37 °C e em 5% de CO_2 por 48 horas. Foram utilizados controles sem adição da toxina ou das frações, sem adição de LPS/ IFN-γ. O volume final de cada poço foi de 200 µl.

A produção de NO foi determinada através de mensuração de nitritos nos sobrenadantes das culturas celulares (DING et al., 1988). Alíquotas de 50 µl do sobrenadante da cultura foram incubadas com um volume igual de reagente Griess (Promega, Madison, WI, EUA). A D.O. foi determinada em leitor de ELISA (Bio-Rad) ajustado a comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos em µM de NO_2^- com base em curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio ($NaNO_2$).

3.3.4 Determinação da produção de nitrito em células peritoneais de camundongos

Uma vez analisada a atividade da CDT na produção de nitrito por células de linhagem, foram realizados experimentos utilizando-se células peritoneais de camundongos, as quais possuem 60 a 80% de macrófagos.

Para tanto foram utilizados camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ isogênicos, fêmeas, com idade de 4 a 5 semanas. Todos os animais foram fornecidos pelo biotério de camundongos isogênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e os procedimentos aprovados pelo comitê de ética de pesquisa em animais.

Foram realizados dois modelos de experimento: um utilizando células peritoneais de camundongos primadas com concanavalina A e outro utilizando células não primadas.

Inicialmente, camundongos foram primados intraperitonealmente com 20 µg de Con A (Sigma-Aldrich), após 48 horas as células foram removidas por lavagem peritoneal com 5 ml de PBS estéril, as suspensões celulares foram mantidas a 0 °C, em meio RPMI (Sigma-Aldrich) completo, até a realização dos

experimentos, contendo Hepes (10 mM, Sigma-Aldrich), bicarbonato de sódio (11 mM, Sigma-Aldrich), L-glutamina (2 mM, Sigma-Aldrich), L-aspargina (23 mM, Sigma-Aldrich), ácido pirúvico (0,1 mM, Sigma-Aldrich), ácido fólico (1 mM, Sigma-Aldrich), estreptomicina (100 µg/ml, Merck), penicilina G (100 U/ml, Sigma-Aldrich) e soro fetal bovino (5%, Cultilab).

Para o ensaio, foram utilizadas $2x10^5$ células/poço, seguido da adição de IFN-γ (2 µg/ml, Sigma-Aldrich) e da CDT reconstituída em concentrações de 30, 25 ou 15 µg/ml de cada fração. As subunidades separadas foram adicionadas a uma concentração de 30 µg/ml cada. Como controles foram utilizados poços contendo somente células e poços contendo IFN-γ.

Camundongos não primados foram utilizados, em que após a remoção das células peritoneais foram adicionados LPS (500 ng/ml, Sigma-Aldrich) ou de Con A, a uma concentração de 5 µg/ml, juntamente com IFN-γ (2 µg/ml) e da toxina reconstituída em concentrações de 30, 25 ou 15 µg/ml de cada fração. As subunidades separadas foram adicionadas a uma concentração de 30 µg/ml cada. O volume final por poço foi de 200 µl e os experimentos realizados em triplicata. Como controles foram utilizados poços contendo somente células e poços contendo ConA ou LPS/ IFN-γ. A produção de NO foi determinada através de mensuração de nitritos nos sobrenadantes das culturas celulares como descrito no item 3.3.3 (DING et al., 1988).

3.3.5 Teste de viabilidade celular com MTT após análise da produção de NO

Para o teste de MTT, após a remoção do sobrenadante para realização da dosagem de NO, foram adicionados a cada poço 50 µl de meio completo e 10 µl de MTT (5mg/ml de 3-{4,5-dimetiltiazol -1il}-2,5-difenil brometo de tetrazólio em solução salina tamponada com fosfato, Sigma-Aldrich). As placas foram incubadas por 3 horas em estufa contendo 5% de CO_2 a 37 °C. Após este período, 100 µl de solução de SDS 10% em 0,01 N de HCl foram adicionados a cada poço. Após 20 horas, a D.O. foi determinada a um comprimento de onda 540 nm. Foram considerados 100% de viabilidade celular o resultado obtido para os respectivos controles.

3.3.6 Análise da produção de citocinas

Foi analisada a produção de citocinas IL-10 e IL-12, através de kits de ensaios de ELISA (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA), pelos macrófagos Raw 264.7 e pelas células peritoneais de camundongo ativados com ConA. Os sobrenadantes foram obtidos dos experimentos realizados anteriormente, os quais haviam sido armazenados a uma temperatura de -20 °C (itens 3.3.3 e 3.3.4).

Foram adicionados 100 µl de solução anticorpo específico para cada citocina em uma concentração de 1 µg/ml por poço em placas de 96 poços (Costar, EUA). As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 16 horas. Em seguida, foram acrescentados 300 µl de solução bloqueadora contendo 1 % de BSA e 1 % sacarose em PBS/Tween 20 a 0,1%, incubados por 1 hora a temperatura ambiente e então adicionados os padrões ou os sobrenadantes em um volume de 100 µl. As placas foram incubadas por mais 2 horas a temperatura ambiente. Foi adicionado o anticorpo de detecção a uma concentração de 0,25 µg/ml seguido de incubação por 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagem, foi adicionada solução de conjugado avidina-peroxidase (1:2000) e incubada por 30 minutos. Entre cada etapa, os poços foram lavados 4 vezes com solução de PBS/Tween 20 a 0,1%. A reação foi revelada pela adição do substrato OPD (o-phenylenediamine) (Sigma-Aldrich, EUA) em tampão citrato-fosfato, 50 mM, pH 5,0, incubada por 10 minutos e bloqueada com 2,5 N de solução de ácido sulfúrico. A leitura da D.O. foi realizada em comprimento de onda de 405nm em leitor de ELISA (BioRad, EUA). Os valores da D.O. obtidos foram comparados à curva padrão e os resultados expressos em pg/ml.

3.3.7 Análise estatística

Para análise estatística da produção de NO, IL-10 e IL-12 foi utilizado o teste de análise de variância ANOVA juntamente com o pós teste de comparação múltipla de Tukey. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando $p<0,05$.

3.4 Fase 2- Determinação dos títulos séricos de IgG contra CDTA, CDTB, CDTC e de *A. actinomycetemcomitans* sorotipos a, b e c

3.4.1 População estudada e amostras de soro

Foram estudados soros de 52 pacientes com periodontite e 28 indivíduos periodontalmente saudáveis (N=80) selecionados na Universidade Federal de São Paulo e Universidade de Guarulhos, sendo as amostras gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Luiz Antônio De-Gennaro e pelo Prof. Dr. Marcelo de Faveri, respectivamente. O exame clínico, coleta das amostras e a utilização das mesmas foram aprovadas pelos Comitês de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Escola Paulista de Medicina de São Paulo (UNIFESP) e do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. Todos os pacientes com periodontite foram submetidos a tratamento após o exame clínico e coleta de amostras.

Os pacientes com periodontite foram classificados da seguinte maneira: periodontite agressiva localizada (PAgL, n=24), idade entre 13 a 28 anos; periodontite agressiva generalizada (PAgG, n= 11), idade entre 18 e 30 anos; periodontite crônica (PC, n=17), idade entre 33 e 57 anos. A classificação foi realizada através da mensuração de parâmetros clínicos como profundidade de bolsa (PB), nível de inserção, sangramento a sondagem e perda de osso alveolar (ARMITAGE, 1999). Foram considerados como indivíduos periodontalmente saudáveis aqueles com ausência de evidência de perda de inserção por periodontite e PB< 3 mm. A caracterização dos pacientes quanto a condição periodontal, idade, gênero e etnia está descrita no anexo A. Foram excluídos deste estudo indivíduos que utilizaram antibiótico ou que foram submetidos ao tratamento periodontal durante os últimos 12 meses e aqueles que relataram doenças sistêmicas associadas à progressão da doença periodontal como diabetes e quadros de imunossupressão.

As amostras do sangue periférico foram coletadas por venipuntura em tubos “vacutainer” isentos de reagentes anticoagulantes. As amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por 5 min (Eppendorf, modelo 5402, Hamburg, Alemanha) e os sobrenadantes aliquotados e armazenados em freezer a -20 ºC.

3.4.2 Determinação dos níveis séricos de IgG contra *A. actinomycetemcomitans* sorotipos a, b e c.

Com o objetivo de verificar a resposta contra a bactéria e confrontá-la aos resultados obtidos dos níveis de IgG contra a CDT, foram determinados os títulos de IgG dos 80 indivíduos contra células totais dos sorotipos mais prevalentes de *A. actinomycetemcomitans*: a, b e c. Foram utilizadas as bactérias ATCC 25932 (sorotipo a), JP2 (sorotipo b) e SA1151 (sorotipo c), cedidas pela Profa. Dra. Sirkka Asikainen, Universidade de Umea, Suécia. As bactérias foram cultivadas em placas de Ágar Triptone Soja (TSBYE) (Oxoid Ltda, Hampshire, Inglaterra) contendo 0,6% de extrato de levedura (Oxoid) e incubadas em estufa com atmosfera de 10% de CO_2 (Shel Lab, Cornelius, OR, EUA) por 48 horas a 37° C. O preparo do antígeno e a reação de ELISA foram realizados segundo Ebersole et al. (1980) com algumas modificações. As bactérias foram removidas da superfície do ágar e ressuspensas em 1x PBS, seguindo-se centrifugação. A seguir, foram lavadas por três vezes em 1x PBS contendo 1 mM de EDTA e ressuspensas em 0,5% de formalina. A suspensão bacteriana foi mantida em temperatura ambiente por 16 horas e deixadas em 0,02% formalina para armazenamento a temperatura de 4 °C até o uso.

Foram adicionados 200 µl de bactéria/poço em suspensão padronizada ($D.O._{580nm}$ = 0,3 em tampão 0,1 M carbonato de sódio pH 9.6) e incubados a 37 °C por 2 horas e a 4°C por 16 horas. Os poços foram preenchidos com solução bloqueadora (leite desnatado Molico a 5 % em PBS/Tween 20 a 0,1%) e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente. Alíquotas de 100µl de cada soro nas diluições de 1:10.000, 1:20.000 e 1:40.000 foram adicionados, seguindo-se incubação a 4 ^{o}C por 16 horas. Em seguida foi adicionado anticorpo anti-IgG humana conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich), diluído 1:5.000 e incubados por 90 minutos em temperatura ambiente. Entre cada etapa foram realizadas 3 lavagens com tampão de lavagem PBS/Tween 20 a 0,1%. A reação foi revelada pela adição do substrato OPD (o-phenylenediamine, Sigma-Aldrich) em tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 5,0 e incubação por 10 minutos. A leitura da D.O. foi realizada em comprimento de onda de 490 nm em leitor de ELISA (Modelo 680, BioRad).

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Em todas as placas foram utilizados como controle: 1. (soro), anti IgG conjugado e substrato, sem a adição da bactéria (branco); 2. (proteínas), anti IgG conjugado e substrato, sem adição de soro; 3. (proteína e substrato), sem adição de soro e de anti IgG conjugado; 4. Como controle foi analisado em todas as placas, soros de 5 indivíduos periodontalmente saudáveis.

3.4.3 Purificação das proteínas CDTA, CDTB e CDTC

As subunidades CDTA e CDTB foram obtidas após clonagem dos genes *cdtA* e *cdtB* e expressão em *E. coli*, como descrito nos itens 3.2 e 3.2.1. A subunidade CDTC foi obtida de uma amostra de *E. coli* recombinante cedida pelo Professor Doutor Joseph, utilizando a metodologia de purificação de acordo com Mao e Dirienzo, 2002 como descrito no item 3.3.

3.4.4 Determinação dos níveis séricos de IgG contra CDTA, CDTB e CDTC

Foram realizados ensaios de ELISA utilizando soros dos 80 indivíduos para determinar a resposta de IgG contra a proteínas CDTA, CDTB e CDTC.

Placas de 96 poços (Corning-Costar, Lowell, MA, EUA) foram recobertas com 100 µl de cada subunidade/poço em concentração de 1 µg/ml, incubadas por 2 horas à 37 ^{o}C e à 4 ^{o}C por 16 horas. Os ensaios foram realizados como descrito no item 3.4.2, com exceção que os soros de pacientes foram diluídos 1:50 e 1:150 e o anticorpo anti-IgG humana conjugado com peroxidase foi utilizado na diluição1:2000. A leitura da D.O. foi realizada em comprimento de onda de 490nm em leitor de ELISA (BioRad).

3.4.5 Atividade neutralizadora do soro contra a CDT

Uma vez determinado o título de IgG contra a CDT, foram selecionados os soros pacientes com diagnóstico de PAgG que apresentaram resposta para pelo menos uma das subunidades CDT e verificada a capacidade de neutralizar a atividade da holotoxina em cultura celular. Para tanto, a holotoxina CDT foi reconstituída por 1 hora utilizando uma concentração de 15 µg/ml de cada

subunidade. Em seguida, o soro foi adicionado em uma diluição de 1:20 e 1:10 e incubado por 20 minutos a temperatura ambiente. Como controle foi utilizado um soro de paciente periodontalmente saudável. Células CHO-9 foram adicionadas em poços de placas de 96 poços (1 x 10^5 células/poço), a mistura toxina-soro adicionada e incubada por 72 horas em ambiente com 5% de CO_2. Após 72 horas a proliferação celular foi analisada utilizando o ensaio de MTT como descrito no item 3.3.5. A atividade neutralizadora dos soros foi estimada pela determinação da porcentagem de células sobreviventes comparadas com as células controles não exposta à toxina.

3.4.6 Análise dos resultados

Os experimentos de ELISA foram realizados em triplicata. Os valores médios das $D.O._{490nm}$ foram obtidos e destes subtraídos o valor do branco. Para verificar as variações entre cada experimento realizado, para cada placa de 96 poços foram sempre analisados soros de cinco pacientes, e os valores de D.O. normalizados.

Foram obtidos os valores médios e desvios padrões da D.O. do ensaio de ELISA para cada soro analisado para os diferentes sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* e para as subunidades CDT.

Com o objetivo de determinar o nível de corte (*cut-off)* para soros reativos e não reativos para os sorotipos a, b e c de *A. actinomycetemcomitans*, CDTA, CDTB e CDTC, os valores foram corrigidos baseado na seguinte fórmula (DESHPANDE, 1996).

Fx = **Valor médio da D.O –[mc + 2x dpc]** onde:

Fx = valor corrigido da D.O de ensaio de ELISA para *A. actinomycetemcomitans* (F_{Aa}) ou para as subunidades CDT (F_{CDT}).

Valor médio da D.O = valor médio da D.O., em experimento em triplicata, obtida pelo ensaio de ELISA com soro do paciente usando diferentes sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* ou subunidades CDT como antígeno.

mc= valor médio da D.O. obtida em ensaio de ELISA dos controles (29 pacientes saudáveis, os quais apresentaram baixa leitura da absorbância para todos os sorotipos e de 6 pacientes saudáveis com baixos níveis de anticorpo para as subunidades CDT).

Dpc= Desvio Padrão dos controles.

A fórmula significa que foram considerados reativos os soros de pacientes que apresentaram após o teste de ELISA, valores de D.O. corrigidos (Fx) maiores do que a média mais 2 vezes o desvio padrão dos valores obtidos com soro de pacientes saudáveis controles.

Correlação de Spearman e teste ANOVA foram empregados para correlação e verificação da significância, respectivamente, dos títulos de IgG contra os sorotipos de *A. actinomycetemcomitans*, CDTA, CDTB, CDTC, diagnóstico periodontal, e também OMP100 e OMP29, em que estes dois últimos resultados foram obtidos por Brunheira (2006). Para ilustrar diferenças entre grupos de indivíduos nas análises com CDT, foi realizado teste exato de Fisher. Para comparar os dados de ELISA obtidos com os resultados do *checkerboard* para detecção de *A. actinomycetemcomitans* das amostras subgengivais dos pacientes PAgG (FAVERI et al., 2008), foi utilizado o teste não paramétrico de Spearman. Valores de $p<0,05$ foram considerados significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção e purificação das proteínas CDTA, CDTB e CDTC

Para a clonagem dos genes *cdtA* e *cdtB*, os amplicons obtidos através de reação de PCR foram ligados em plasmídeos pRSET e pTHIOhis, respectivamente, e eletroporados em cepas de *E. coli*. Os plasmídeos recombinantes foram analisadas por restrição, utilizando *Sac*I e *Pst*I (Figura 1) e a identidade dos insertos foi confirmada por sequenciamento parcial (dados não demonstrados). As bactérias recombinantes foram denominadas *E. coli* BL21(DE) pLYS pRSETacdtA e *E. coli* TOP10 pcdtBHis cdtB.

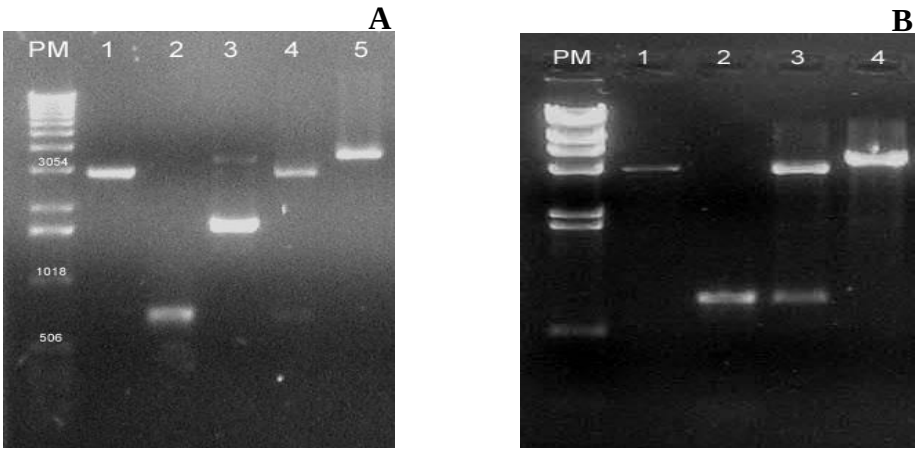


Figura 1-Confirmação da presença dos genes *cdtA* (**A**)e *cdtB* (**B**) nas recombinantes *E. coli* BL21(DE) pLYS pRSETacdtA e *E. coli* TOP10 pcdtBHis em gel de agarose a 1 %. Em **A**, pRSETa digerido com as enzimas de restrição *Sac*I e *Pst*I com o tamanho de 2,9kb (1), produto de PCR do *cdtA* com 709pb (2), pRSETa sem digerir (3), digestão do pRSETcdtA com *Sac*I e *Pst*I (4) e com *Pst*I (5) e Em **B**, pThioHisB digerido com as enzimas de restrição *Sac*I e *Pst*I com 4,4kb (1), produto de PCR do *cdtB* com 880pb (2), digestão do pcdtBHis com *Sac*I e *Pst*I (3) e com *Pst*I (4).

Em seguida foi realizado experimento piloto das induções das proteínas para verificar as condições ótimas de expressão. O tempo de 4 horas de indução (após a adição de IPTG) foi considerado ideal para ambas as proteínas (Figura 2). Para purificação de CDTC obtida da cepa recombinante *E. coli* BL21(DE) pET15bcdtc foi realizada conforme Mao e DiRienzo (2002). Em seguida, as três proteínas foram expressas e purificadas (Figura 3). A confirmação da presença

da proteína foi realizada em gel SDS-PAGE corado pelo sistema Invision (Invitrogen) que detecta a cauda de histidina fusionada à respectiva proteína (resultado não demonstrado). Para a CDTB foi realizada a remoção da cauda de histidina através da utilização da enzima enteroquinase (Figura 3B).

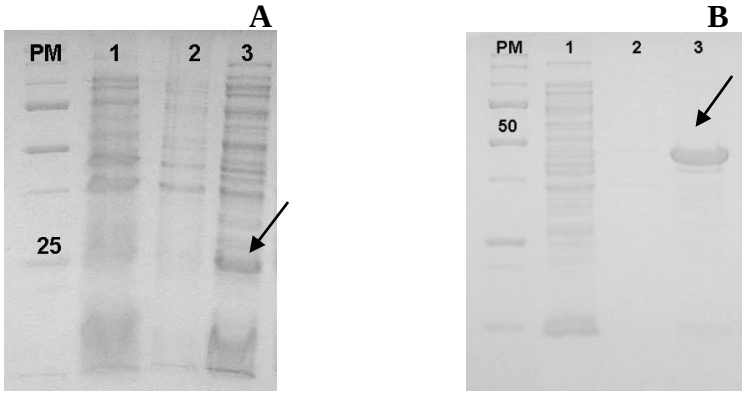


Figura 2-Gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE de alíquota das culturas de *E. coli* recombinante após a indução da expressão com IPTG por 4 horas de CDTA (**A**) e CDTB (**B**). PM: marcador de peso molecular (Precision protein standard, Bio-Rad) em KDa; 1. sobrenadante do lisado bacteriano sem indução; 2 e 3. precipitado e sobrenadante, respectivamente. A seta indica a banda correspondente à proteína CDT.

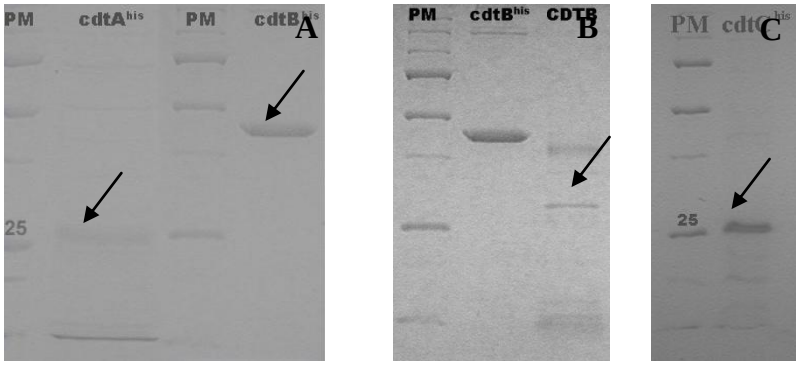


Figura 3-Gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE das proteínas CDT recombinantes purificadas. Em **A**, CDTA, CDTB com a cauda de histidina. Em **B**, CDTB após a clivagem da cauda de histidina. Em **C**, CDTC com a cauda de histidina. PM: marcador de peso molecular (Precision protein standard, Bio-Rad) (BIORAD, EUA) em kDa. A seta indica a banda correspondente à proteína CDT.

A purificação das subunidades CDTA, CDTB e CDTC obtidas a partir de cepas de *E. coli* BL21(DE) pET15bcdtA, *E. coli* BL21(DE) pET15bcdtB e *E. coli* BL21(DE) pET15bcdtc, respectivamente, foi realizada conforme descrito anteriormente (MAO e DiRIENZO, 2002).

4.2 Fase 1-Verificação da atividade CDT em células epiteliais e macrofágicas

4.2.1 Detecção da atividade CDT

Foram realizados experimentos utilizando as subunidades CDT purificadas e reconstituídas para verificar a atividade tóxica em células epiteliais gengivais (OBA-9) e células macrofágicas Raw 264.7. Como controle foram utilizadas células CHO-9, uma vez que a atividade tóxica da proteína reconstituída já havia sido estabelecida neste tipo celular (MAO e DIRIENZO, 2002).

Inicialmente, as toxinas recém misturadas foram inoculadas em células CHO-9, (CDTA/CDTB/CDTC). Os dados apresentados na figura 4 demonstram que CDT não reconstituída não exerceu efeito tóxico nas células. Além disso, as subunidades separadas apresentaram uma baixa atividade tóxica. Em contrapartida, quando as misturas das toxinas foram previamente incubadas por 1 hora sob agitação e a CDT reconstituída, foi demonstrada uma alta atividade tóxica. O efeito da toxina reconstituída foi determinado pelo número de células sobreviventes ao tratamento, sendo que 77 (49%) das unidades formadoras de colônia (UFCs) sobreviveram a CDTA/CDTB/CDTC nas concentrações de 15 µg/10 µg/15 µg por poço respectivamente, enquanto apenas 41 (26%) das UFCs sobreviveram às concentrações de 30 µg/10 µg/30 µg por poço, conforme demonstrado na figura 5. Estes resultados indicam que a atividade tóxica só é obtida com a holotoxina reconstituída, pois a incubação prévia permite que as subunidades CDTA, CDTB e CDTC se agreguem, formando a estrutura terciária da toxina.

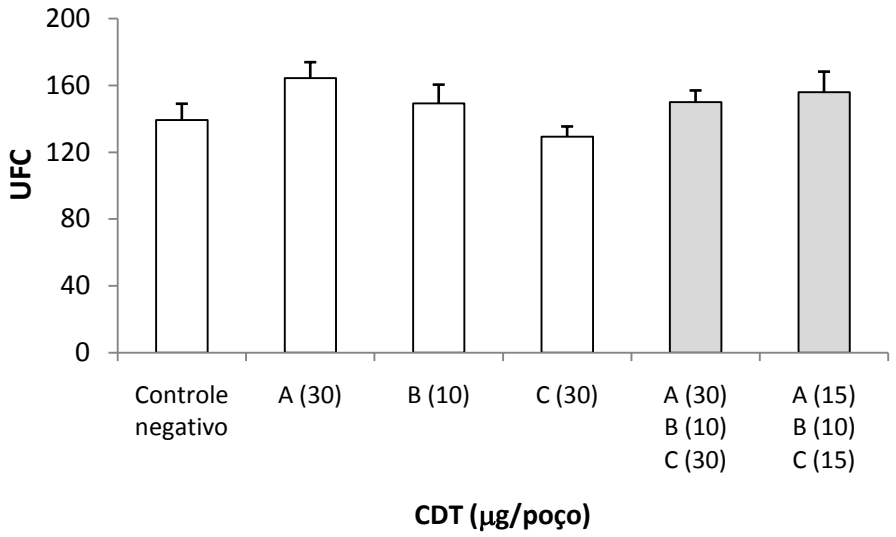


Figura 4-Atividade CDT em células CHO-9 quando as subunidades foram misturadas, porém sem reconstituição. As células foram incubadas por 7 dias e as viáveis detectadas pela contagem das UFCs. Foram adicionadas 240 células/poço. Barras brancas: controles (Controle negativo sem adição de toxina e adição das subunidades CDTA, B e C separadamente; Barras cinzas: adição da mistura contendo diferentes concentrações de CDTA, B e C). A quantidade de proteína usada está demonstrada em µg/poço (eixo x).

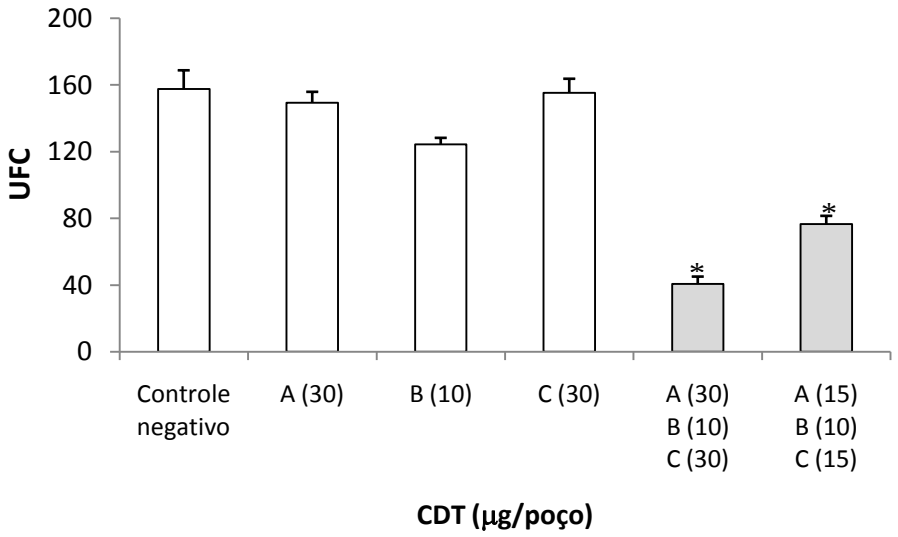


Figura 5-Atividade CDT em células CHO-9 após reconstituição da holotoxina por 1 hora a 0 °C. As células foram incubadas por 7 dias e as viáveis detectadas pela contagem das UFCs. Foram adicionadas 240 células/poço. Barras brancas: controles (Controle negativo e as subunidades CDTA, B e C separadas); Barras cinzas: solução com a CDTA, B e C resconstituída. A quantidade de proteína usada está demonstrada em µg/poço (eixo x). ANOVA-Tukey, * $p<0,001$ em relação ao controle negativo.

Foi analisada também a atividade tóxica da CDT sobre células epiteliais gengivais OBA-9. O efeito tóxico da toxina CDT foi observado somente para a holotoxina reconstituída, em que tanto na concentração 15 µg/10 µg/15 µg por poço como na 30 µg/10 µg/30 µg por poço nenhuma célula sobrevivente foi observada. Já a subunidade que exerceu maior efeito foi a CDTB, em que apenas 52% das células, aproximadamente, sobreviveram após contato com esta subunidade (Figura 6).

Além disso, foi observada alta atividade tóxica das subunidades CDT sobre os macrófagos Raw 264.7, observando-se redução na viabilidade celular para 30% após adição de CDTB e 13% para CDTC (Figura 7). Esta redução foi ainda maior quando empregada a holotoxina reconstituída, onde apenas 4% e 7% de células foram recuperadas, para as quantidades 30 µg/10 µg/30 µg e 15 µg/10 µg/15 µg por poço de CDTA/CDTB/CDC, respectivamente.

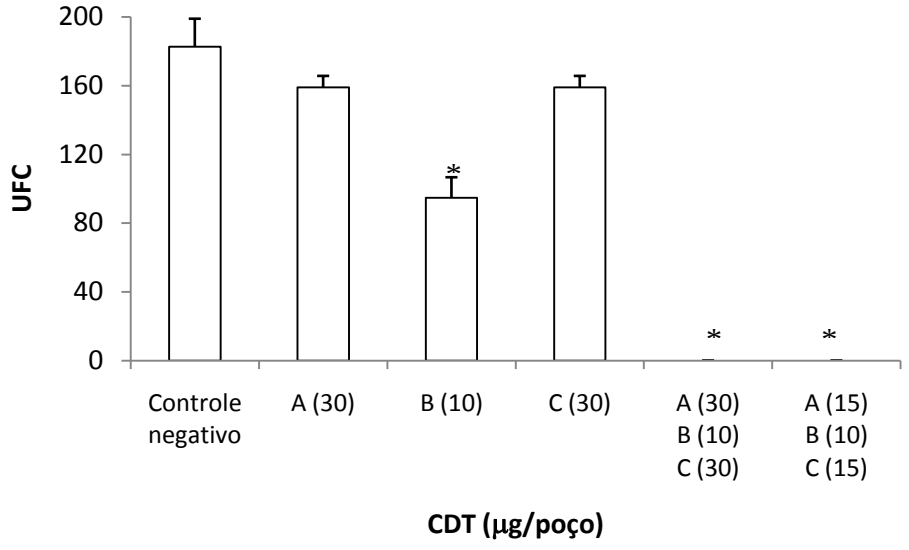


Figura 6-Atividade CDT em células OBA-9 após reconstituição da holotoxina por 1 hora a 0 °C. As células foram incubadas por 7 dias e as viáveis detectadas pela contagem das UFCs. Foram adicionadas 240 células/poço. Barras brancas: controles (Controle negativo e as subunidades CDTA, B e C separadas); Barras cinzas: solução com a CDTA, B e C. A quantidade de proteína usada está demonstrada em µg/poço (eixo x). ANOVA –Tukey, *p<0,001 em relação ao controle negativo.

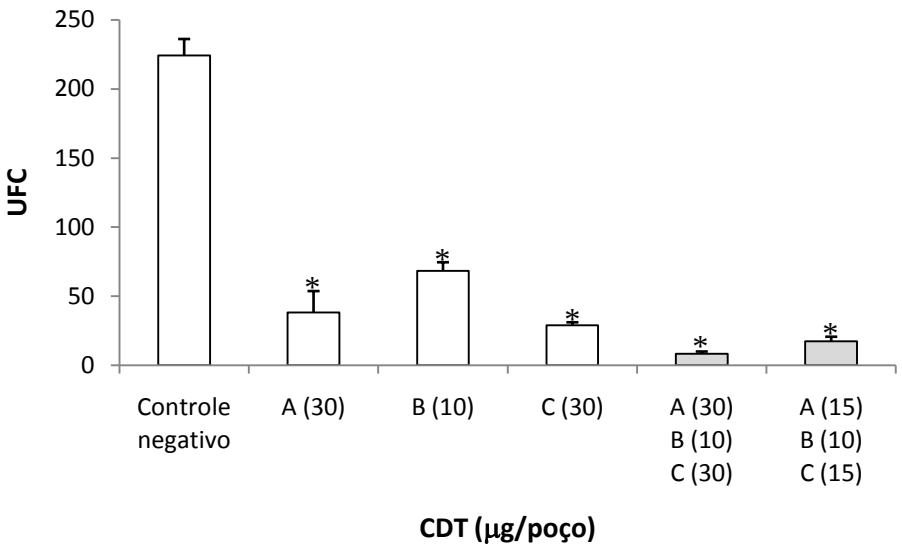


Figura 7-Atividade CDT em células Raw 264.7 após reconstituição da holotoxina por 1 hora a 0 °C. As células foram incubadas por 7 dias e as viáveis detectadas pela contagem das UFCs. Foram adicionadas 240 células/poço. Barras brancas: controles (Controle negativo e as subunidades CDTA, B e C separadas); Barras cinzas: solução com a CDTA, B e C. A quantidade de proteína usada está demonstrada em µg/poço (eixo x). ANOVA-Tukey, * $p<0,001$ em relação ao controle negativo.

4.2.2 Determinação da produção de NO, IL-10 e IL-12 por macrófagos Raw 264.7

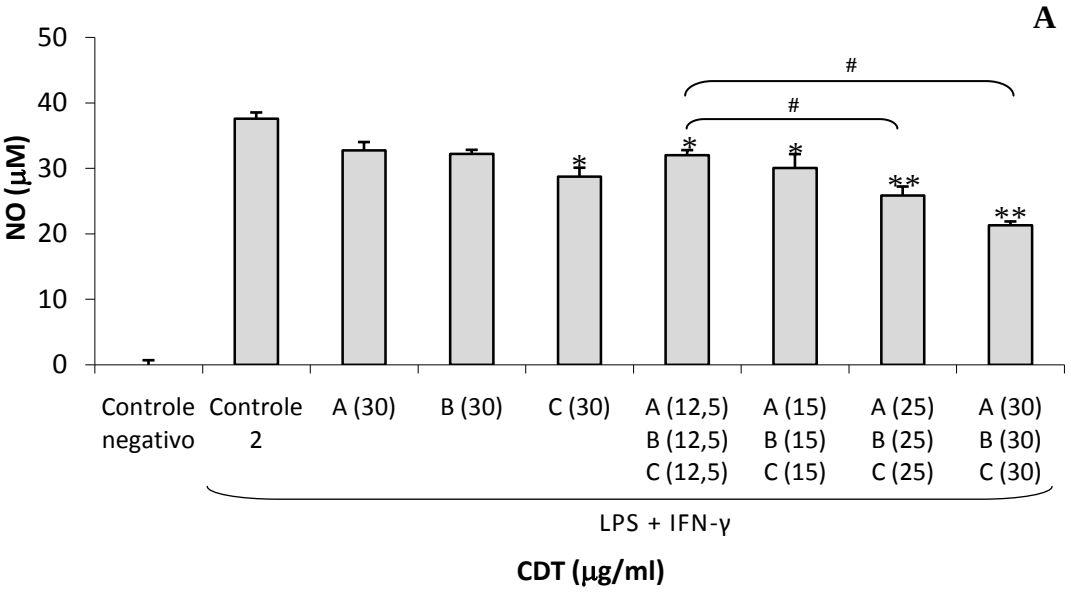
Foram realizados testes com células Raw 264.7 para determinar o efeito da CDT na produção de óxido nítrico (NO) por células ativadas ou não com LPS/ IFN-γ após a adição de diferentes concentrações de CDT reconstituída e das subunidades. Macrófagos ativados por LPS/ IFN-γ exibem produção de NO como pode ser observado no controle 2 (células sem toxina e com LPS/IFN-γ, figura 8A). A adição das subunidades CDTA e CDTB também manteve a produção de NO nos níveis observados após a adição de apenas o LPS/ IFN-γ. Por outro lado, a adição de CDTC e de quantidades crescentes da holotoxina reconstituída inibiu a produção de NO pelos macrófagos ativados por LPS/IFN-γ, sendo que foram observadas diferenças estatisiticamente significante na produção de NO após a adição de CDT em todas as concentrações em relação ao controle 2 (Figura 8A).

Por outro lado, a adição de CDT ou de cada uma das frações na maior concentração empregada sem a adição de LPS/IFN-γ também leva a indução da

produção de NO. No entanto, doses crescentes da toxina reconstituída induzem a menor produção de NO, indicando que também esta indução foi inibida por ação da toxina, a qual é observada nas concentrações de 25 µg/ml e 30 µg/ml de cada subunidade CDT (Figura 9A).

Ao analisar a viabilidade celular, foi observada, em células que receberam LPS/ IFN-γ mais a dose de CDT de 15 µg/ml de cada subunidade, perda de viabilidade significante, porém em doses mais altas, houve a manutenção de células viáveis (Figuras 8B). Já na presença apenas da CDT, houve uma perda de viabilidade das células inoculadas com as subunidades CDT e com as duas doses mais baixas da toxina, e assim como no experimento anterior, houve a manutenção da viabilidade celular nas duas doses mais altas da toxina reconstituída (Figura 9B). Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos por duas vezes em ensaios independentes, mostrando-se reprodutíveis.

Macrófagos podem ser polarizados para produção de citocinas proinflamatórias, como IL-12 ou regulatórias como IL-10. Assim com o objetivo de determinar se a CDT induziria alteração na ativação dos macrófagos foram determinados os níveis destas citocinas em macrófagos ativados com LPS/ IFN-γ após contato com CDT. Ao analisar a figura 10, pode-se verificar uma considerável produção de IL-10 e de IL-12 na dose mais alta da toxina. Entretanto, na figura 11, a presença apenas de CDT na maior concentração (30 µg/ml de cada subunidade), houve a diminuição de IL-10 e aumento de IL-12. Pouca produção de IL-12 foi observada quando as subunidades CDT foram adicionadas separadamente.



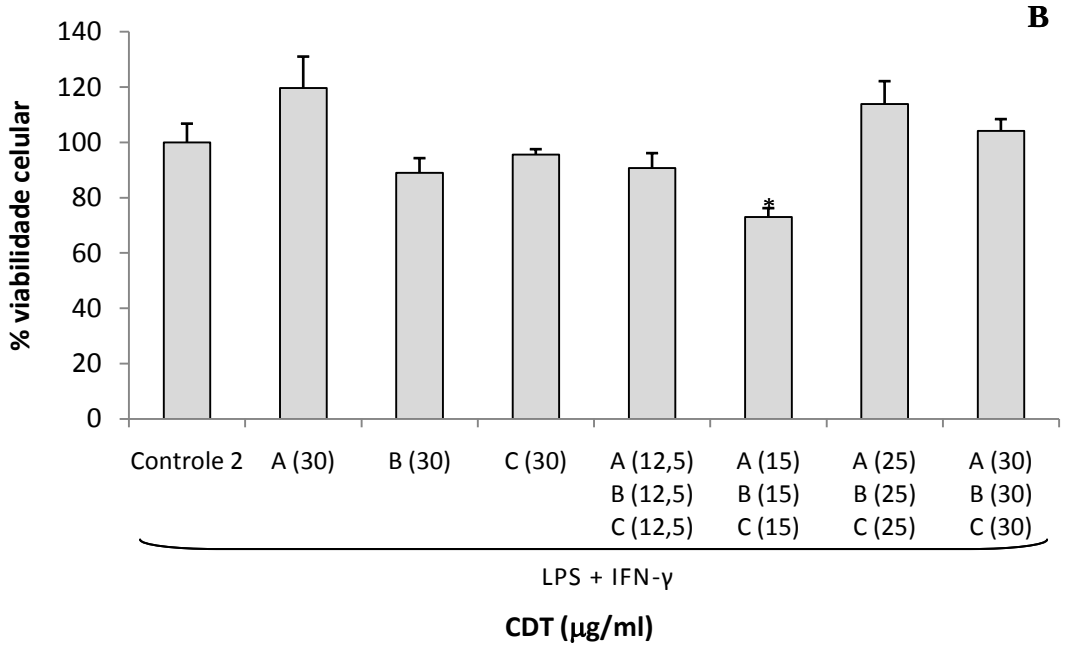


Figura 8-Atividade CDT na produção de NO e na viabilidade celular de macrófagos Raw 264.7 ($2x10^5$ células/poço) ativados com LPS (500 ng/ml) e IFN-γ (2 µg/ml) quando adicionadas diferentes concentrações da CDT reconstituída (CDTA/CDTB/CDTC) e de suas subunidades, em µg/ml. Em **A**, produção de NO (µM). Em **B**, viabilidade celular detectada pelo ensaio de MTT (% de células viáveis). Controle negativo: células não ativadas sem adição de toxina; Controle 2: células ativadas com LPS/ IFN-γ sem adição de toxina. ANOVA-Tukey, * $p<0,01$ e ** $p<0,001$; quando comparados com a adição de LPS e IFN-γ (controle 2). # $p<0,01$ quando comparados com a menor dose da holotoxina reconstituída (12,5 µg/ml) (Figura A).

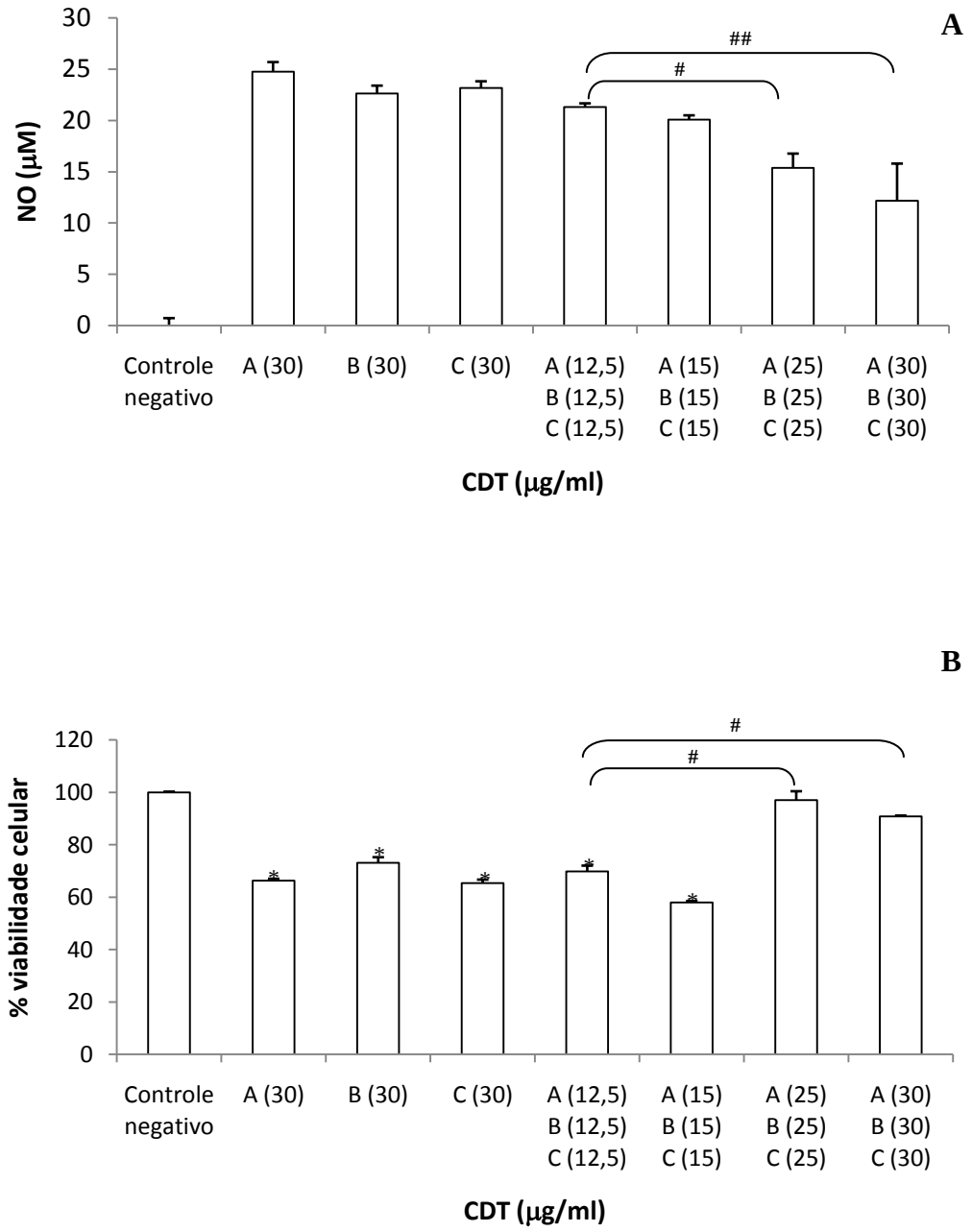
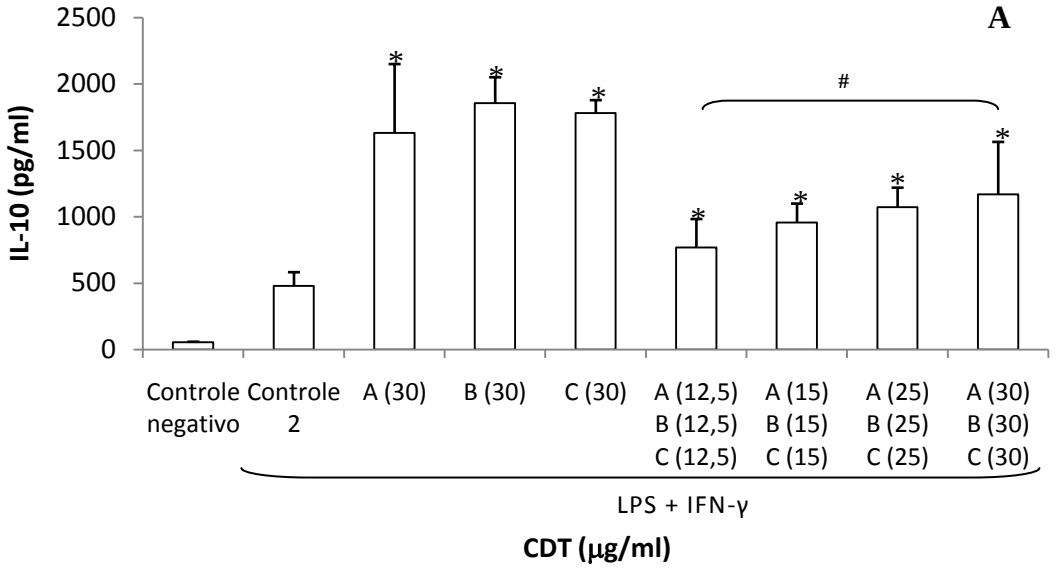


Figura 9-Efeito da adição de diferentes concentrações da CDT reconstituída (CDTA/CDTB/CDTC) e de suas subunidades, em µg/ml, sobre a produção de NO (µM) (**A**) e sobre a viabilidade celular (**B**) detectada em ensaio de MTT (% de células viáveis) de macrófagos Raw 264.7 ($2x10^5$ células/poço). ANOVA-Tukey, # $p<0,01$ quando comparados com a menor dose da holotoxina reconstituída (12,5 µg/ml) e * $p<0,01$, quando comparado com controle negativo.



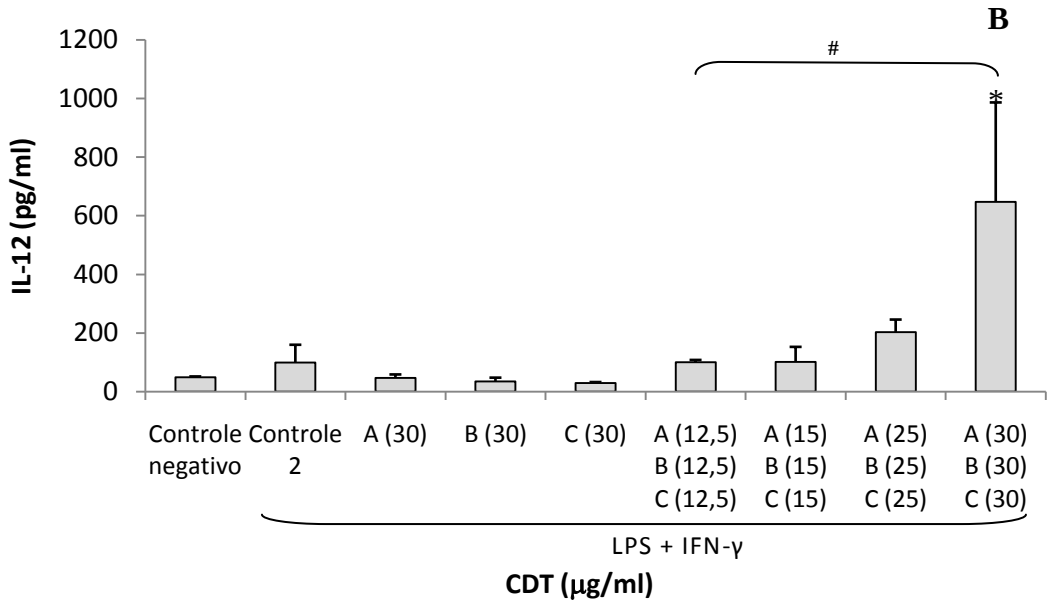


Figura 10-Produção de IL-10 (**A**) e IL-12 (**B**) (pg/ml) por macrófagos Raw 264.7 ativados com LPS (500 ng/ml) e IFN-γ (2 µg/ml) após a adição de CDT reconstituída ou suas subunidades (µg/ml). Controle negativo: células não ativadas; Controle 2: células ativadas com LPS e IFN-γ. ANOVA-Tukey, *p<0,05 quando comparado com controle 2 e # p<0,01 quando comparados com a menor dose da holotoxina reconstituída.

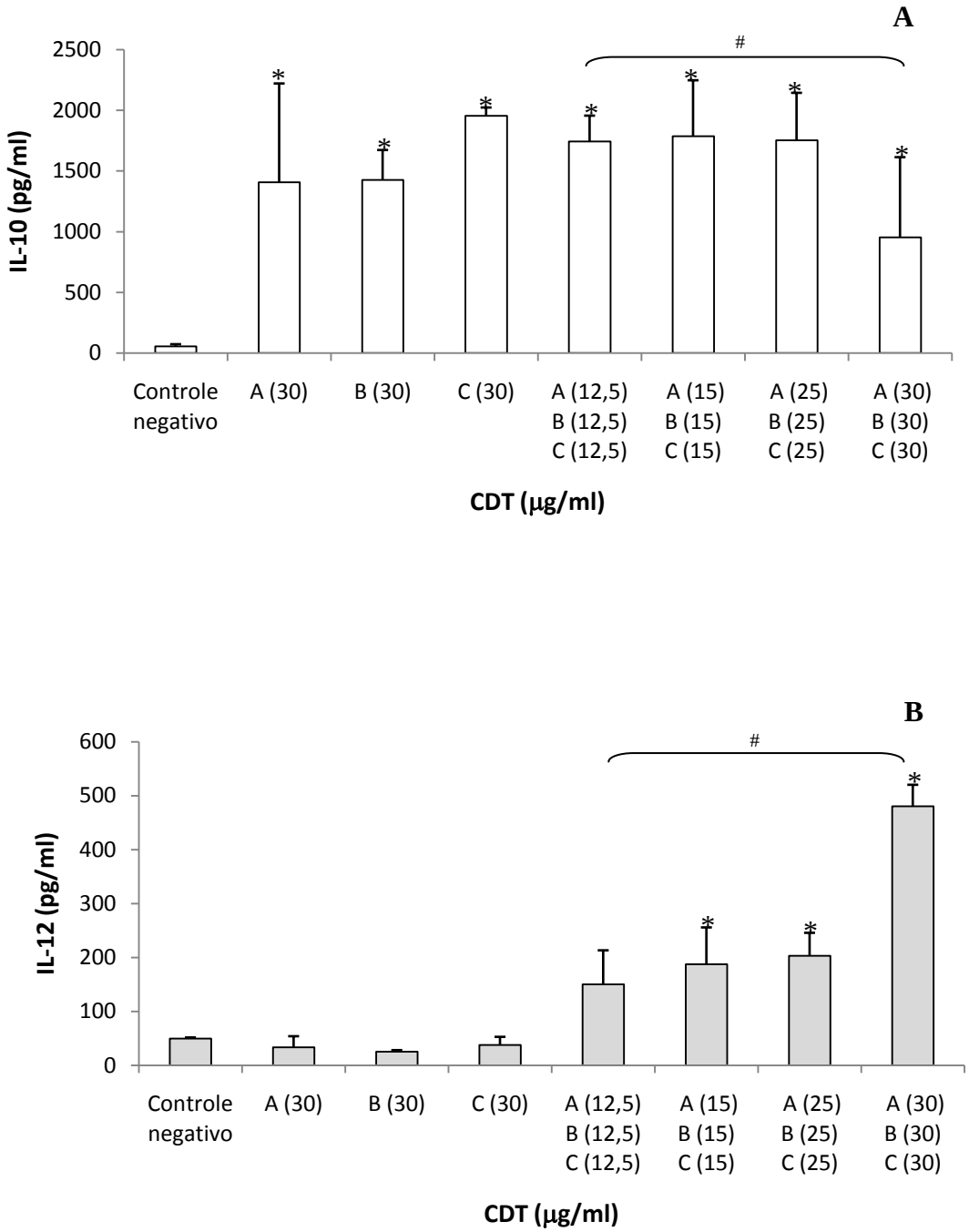
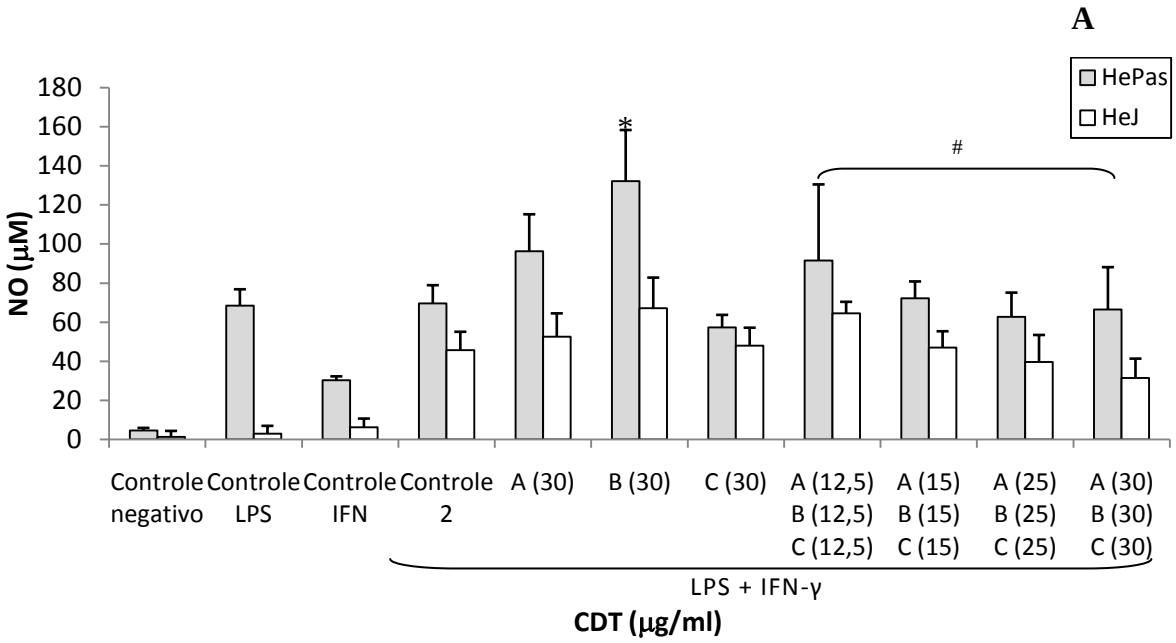


Figura 11-Produção de IL-10 (**A**) e IL-12 (**B**) (pg/ml) por macrófagos Raw 264.7 inoculados com a CDT reconstituída ou suas subunidades (µg/ml). ANOVA-Tukey, *p<0,05 quando comparado com controle negativo sem adição de CDT. # p<0,01 quando comparados com células adicionadas com a menor dose da holotoxina reconstituída (12,5 µg/ml).

4.2.3 Determinação da produção de NO, IL-10 e IL-12 por macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ

Como foi verificada uma inibição da produção de NO por macrófagos de linhagem, após o estímulo com a CDT, foi realizado estudo para analisar se este padrão poderia ocorrer em macrófagos peritoneais. Para tanto, foram utilizados camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ.

Inicialmente, foram analisadas células peritoneais de camundongos que receberam LPS/ IFN-γ. Camundongos C3H/HePas apresentaram um aumento produção de NO quando a subunidade CDTB foi adicionadae. Quando doses da holotoxina foram adicionadas, houve diminuição na produção de NO com a dose mais alta da toxina quando comparada com a mais baixa, Células de camundongos C3H/HeJ com a CDT ou subunidades apresentaram níveis semelhantes ao controle, que recebeu apenas LPS e IFN-γ, porém conforme foi aumentando a dose da CDT, houve discreta diminuição na produção de NO, porém não estatisticamente significante. Em ambas as linhagens de camundongos analisadas, não foi observada perda de viabilidade significante (Figura 12B).



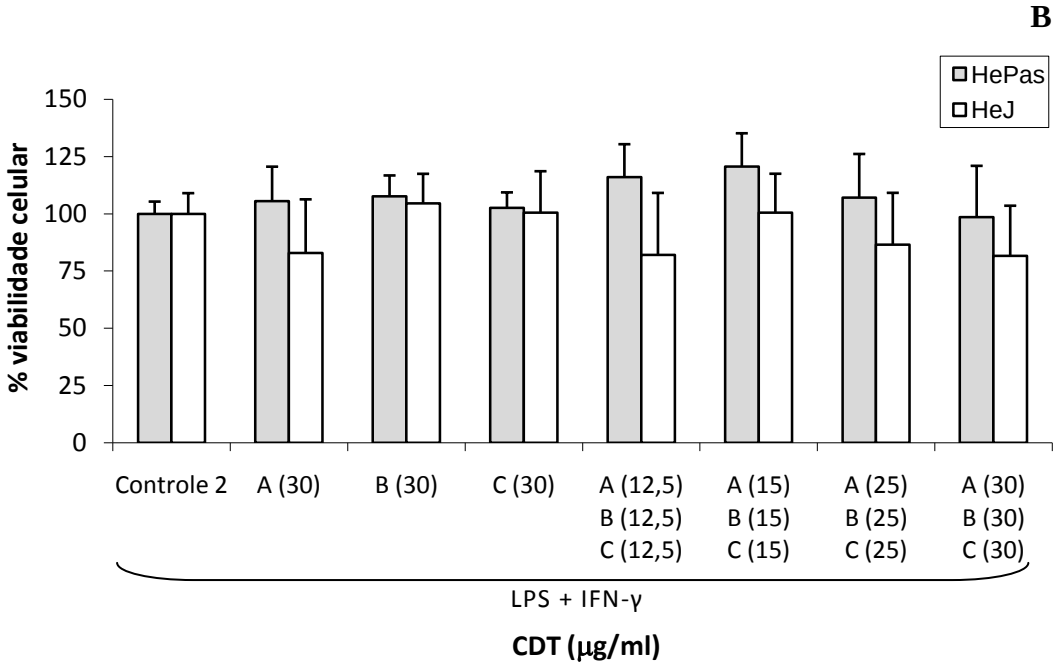


Figura 12-Produção de NO (**A**) e viabilidade (**B**) de macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas (barras cinzas) e C3H/HeJ (barras brancas) ativados com LPS (500 ng/ml) e IFN-γ (2 µg/ml) adicionados de subunidades CDT ou de diferentes concentrações de CDT reconsitituída. Viabilidade analisada por ensaio de MTT. Controle negativo: somente células. Controle 2: células com LPS/IFN-γ Concentração CDT ou subunidades em µg/ml. * $p<0,05$ qundo comparados com controle LPS + IFN-γ. # $p<0,05$ quando comparados com a menor dose da holotoxina reconstituída (12,5 µg/ml) (ANOVA-Tukey). (ANOVA-Tukey).

Com o intuito de confirmar se a produção de NO poderia ser via TLR4 e se poderia haver a sua produção na ausência de LPS, foram realizados experimentos com macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ com adição de Con A durante a realização do experimento (não-rimados) ou 48 horas antes (primados) com adição de IFN-γ.

Pode-se observar que em ambas as linhagens de camundongos, em que as células peritoneais não foram primadas apresentaram aumento na produção de NO em relação ao controle com ConA/ IFN-γ, principalmente quando adicionadas as subunidades separadas e em dose mais baixa da holotoxina (Figura 13A). Nos camundongos C3H/HePas houve uma diminuição na produção de NO de maneira dose dependente, porém não foi estatisticamente significante. Já nos C3H/HeJ conforme a concentração da toxina foi aumentando, a produção de NO foi diminuindo, principalmente na comparação entre a menor dose da holotoxina reconstituída (15 µg/ml) com a maior dose (30 µg/ml) e também com 25µg/ml de cada subunidade (ANOVA-Tukey) (Figura 13A).

A análise da viabilidade celular realizada através do ensaio de MTT demonstrou que houve perda na viabilidade das células peritoneais dos camundongos, principalmente da linhagem C3H/HeJ, quando comparados com o controle com ConA/ IFN-γ. Já em células de camundongos C3H/HePas, houve perda de viabilidade apenas quando subunidades CDT separadas foram adicionadas (Figura 13B).

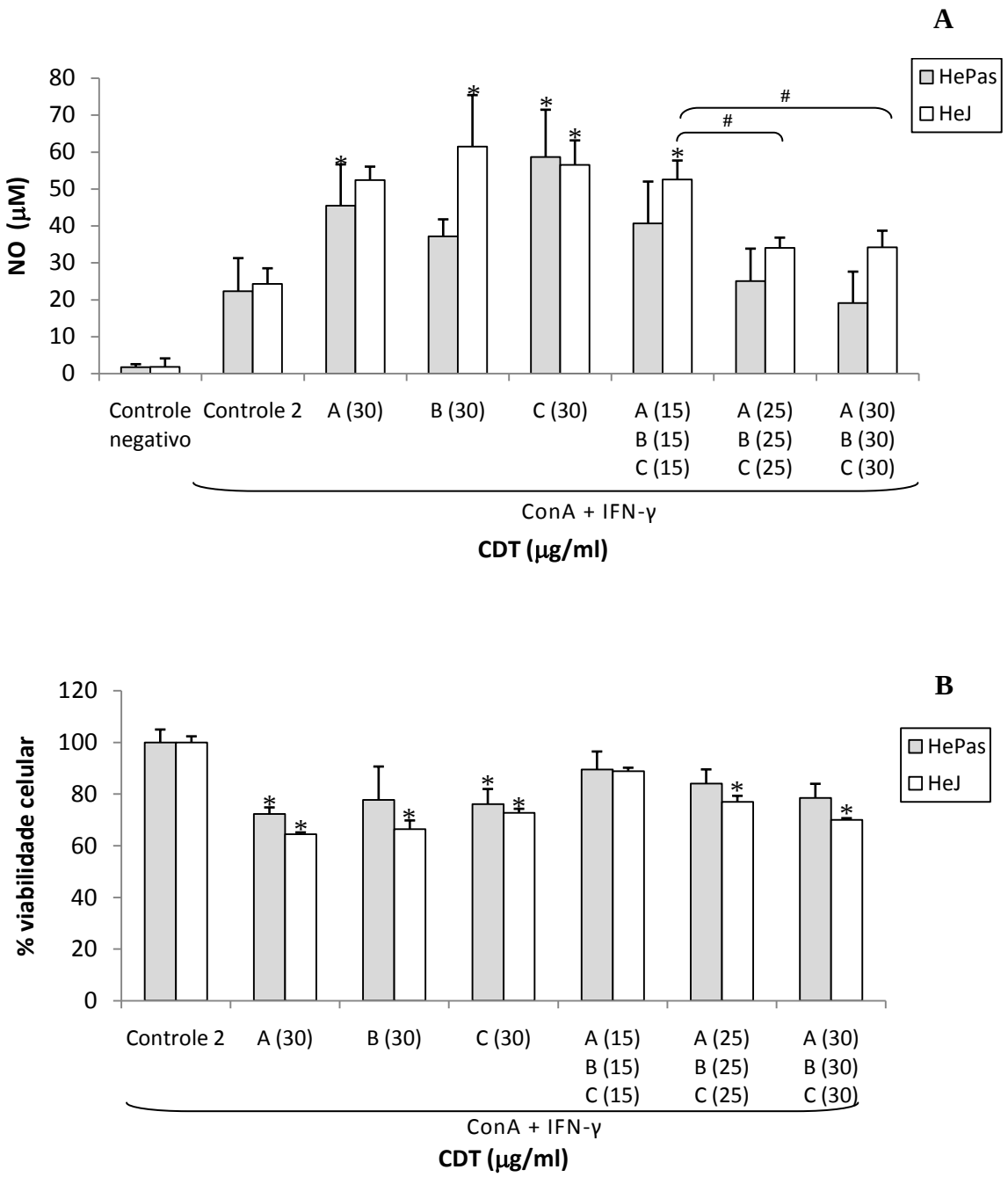


Figura 13-Produção de NO (**A**) e viabilidade (**B**) dos macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas (barras cinzas) e C3H/HeJ (barras brancas) não primados após estímulo com ConA/ IFN-γ acrescidos de diferentes doses de CDT ou suas subunidades. Controle negativo: somente células; Controle 2: células com ConA/ IFN-γ. ConA (5 µg/ml); IFN-γ (2 µg/ml). Concentração CDT ou subunidades em µg/ml. ANOVA-Tukey, * $p<0,05$, quando comparados com controle 2 sem adição de CDT e # $p<0,05$ quando comparados com a menor dose da CDT (15 µg/ml).

Uma vez observada a produção de NO por macrófagos peritoneais residentes de camundongos com a ativação das células com IFN-γ/ ConA, seria interessante se a produção prévia, pelos próprios camundongos, de IFN-γ por linfócitos ativados com ConA (células primadas), levaria a produção de NO. Esta produção pelos macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas pode ser observada na figura 14. O perfil de produção de NO foi muito semelhante tanto nos macrófagos que receberam IFN-γ durante o experimento, assim como aqueles que receberam apenas IFN-γ endógeno, sendo neste último a produção menor em relação ao primeiro. Nestes camundongos a inibição da produção de NO também foi dose dependente. Já na viabilidade, não houve diferença estatisticamente significante em nenhuma das doses de CDT.

Como observado na figuras 15A e B, houve a produção de NO pelos macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HeJ. Pode-se observar de maneira semelhante, que houve a produção de NO, porém com níveis mais altos em relação ao experimento com IFN-γ endógeno do camundongo, principalmente na dose mais baixa da toxina. Além disso, neste caso é evidente a inibição da produção de NO de maneira dose dependente quando comparados a menor dose de CDT e as dua maiores (Figura 15B). Ao se analisar a viabilidade, foi observada uma diminuição de células viáveis quando o IFN-γ foi adicionado (Figura 15D).

Foi verificado também aumento na produção de NO pelas células peritoneais de camundongos primados com ConA quando adicionadas as subunidades CDT separadamente após adição de IFN-γ sendo que não houve diferença entre as distintas frações (Figuras 16A e B). Após a adição das subunidades, a redução na viabilidade celular foi significante nas células peritoneais de camundongos C3H/HeJ mas não nas células de camundongos C3H/HePas (viabilidade entre 51 ~59% e 70 ~84%, respectivamente, figuras 16 C e D).

C3H/HePas

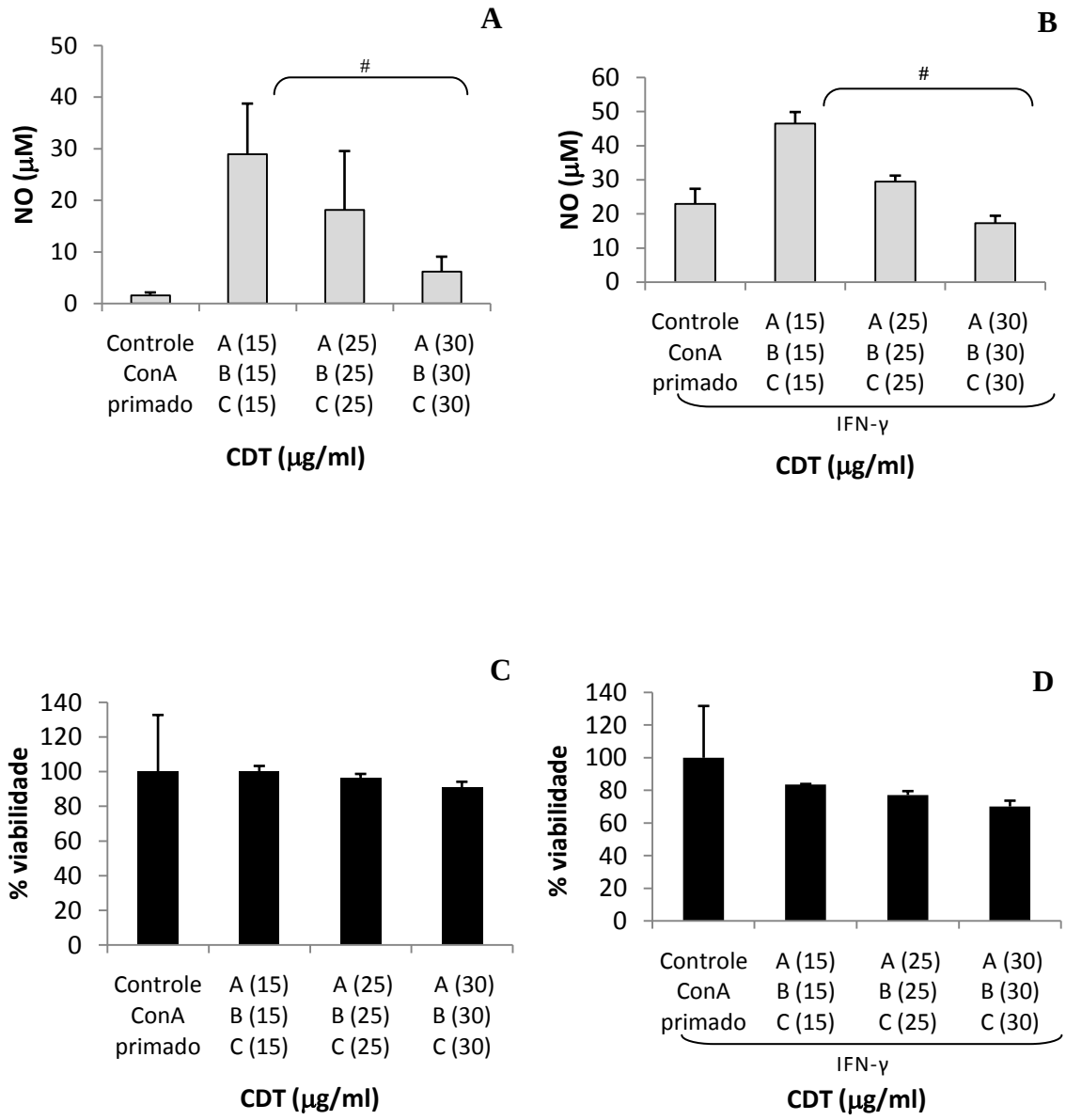


Figura 14-Produção de NO e viabilidade dos macrófagos peritoneais de camundongos C3H/ HePas primados com ConA (20 µg) sem a adição de IFN-γ (**A** e **C**) e com IFN-γ (2 µg/ml) (**B** e **D**). Controle: células primadas in vivo com ConA 48 horas antes da obtenção das células. Concentração CDT em µg/ml. ANOVA- Tukey, # $p<0,05$ quando comparado com a menor dose da holotoxina reconstituída (15 µg/ml).

C3H/HeJ

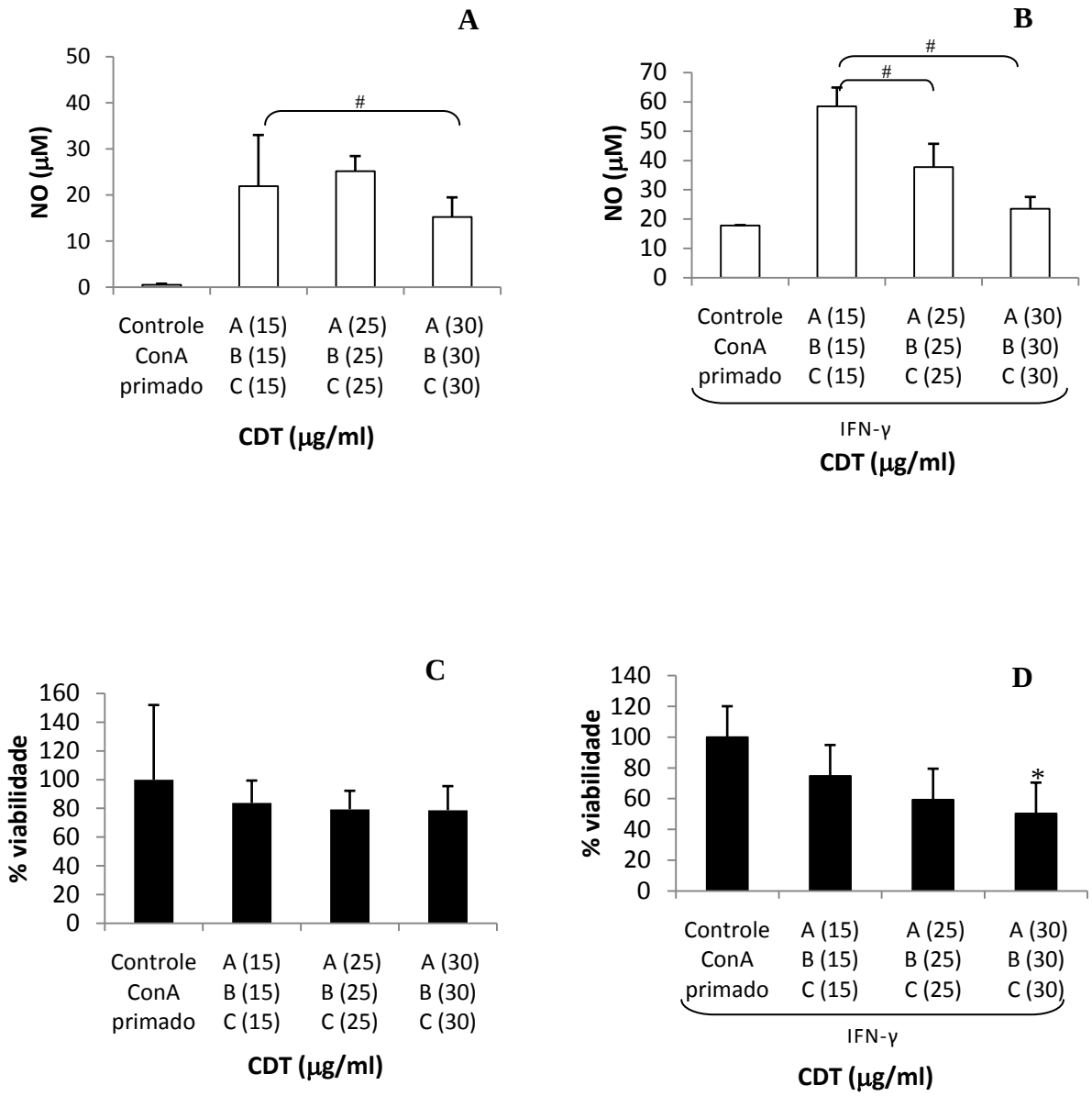


Figura 15-Produção de NO e viabilidade dos macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HeJ primados com ConA (20 µg) sem IFN-γ (**A** e **C**) e com IFN-γ (**B** e **D**). Controle ConA: células primadas com ConA 48 horas antes. Controle ConA + IFN: células primadas com ConA e adicionadas com IFN-γ (2 µg/ml). Concentração CDT em µg/ml. ANOVA- Tukey, * $p<0,05$ quando comparado com seus respectivos controles; # $p<0,05$ quando comparado com a menor dose da holotoxina reconstituída (15 µg/ml

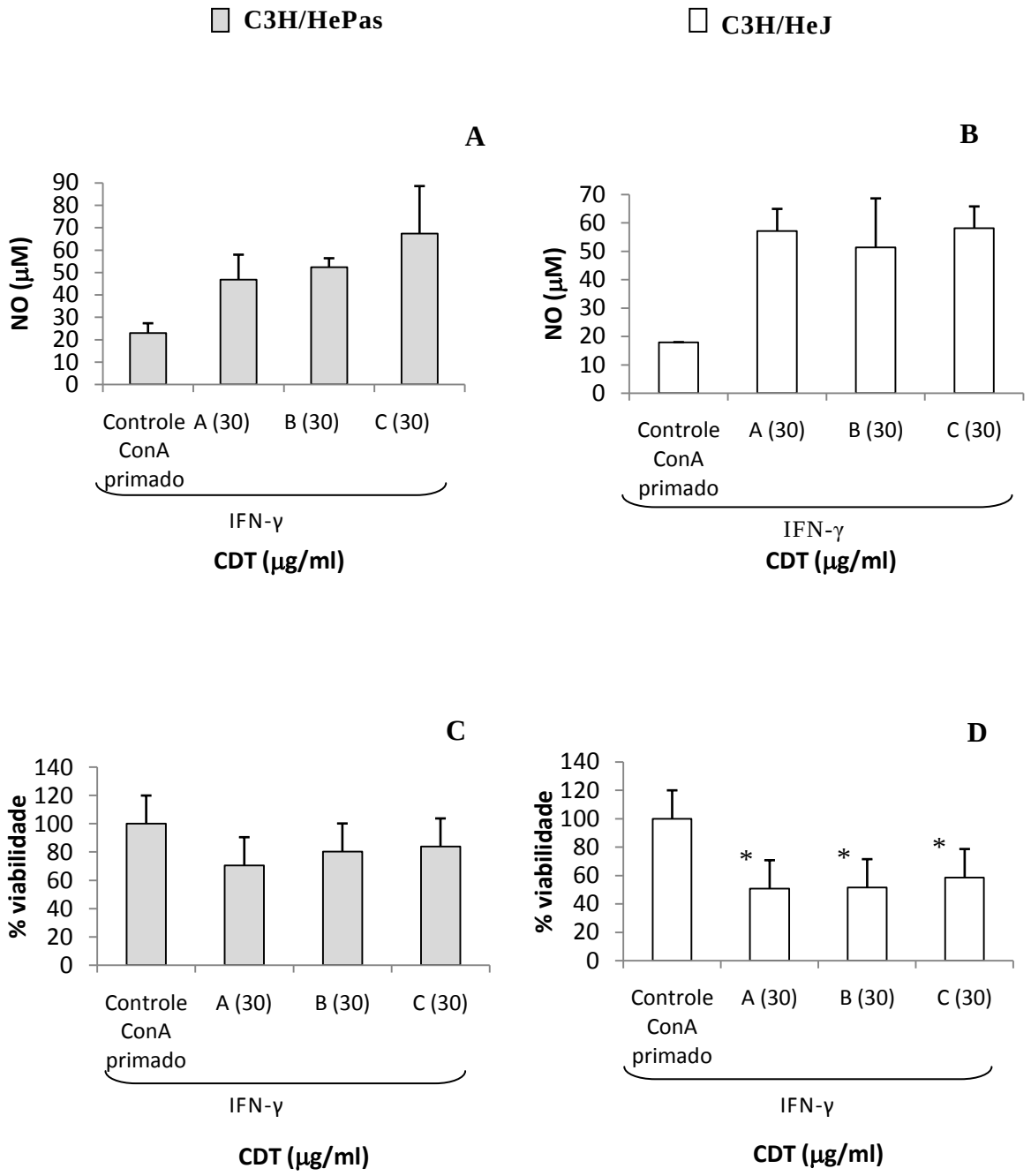


Figura 16-Produção de NO e viabilidade dos macrófagos peritoneais de camundongos C3H/ HePas (**A** e **C**) e C3H/HeJ (**B** e **D**) primados com ConA (20 µg) acrescidos com IFN-γ após adição das subunidades CDT separadamente. Controle ConA + IFN: células primadas com Com A depois adicionado IFN-γ. IFN-γ (2 µg/ml). Concentração das subunidades em µg/ml. ANOVA- Tukey, * $p<0,05$ quando comparado com seus respectivos controles. Acho que deve tirar os dados conA e conA + IFN dos controles, e prolongar a chave do IFN gama até o controle nas figuras B e D

Uma vez demonstrada a capacidade da CDT de inibir a produção de NO pelos macrófagos peritoneais ativados, foram analisados os perfis de citocinas IL-12 e IL-10 produzidos por estas células. Nos camundongos não primados, as células peritoneais ativadas com ConA e IFN-γ de ambas as linhagens produziram níveis semelhantes de citocinas, com produção de IL-10 e não de IL-12 quando as subunidades CDT foram adicionadas separadamente ($p<0,05$, ANOVA). Quando a holotoxina foi adicionada, a produção de IL-10 foi diminuindo conforme a dose da toxina foi aumentando nas duas linhagens murínicas, apesar de não ser estatisticamente siginificante. Na dose mais alta de CDT (30 µg/ml) houve um discreto aumento de IL-12 nas células de camundomgos C3H/HeJ (diferença estatisticamente não significante) (Figura 17).

A produção de citocinas IL-10 e IL-12 pelas células peritoneais de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ primados com ConA, mas sem IFN-γ não diferiu após a adição de diferentes concentrações de CDT (Figuras 18A/C e 19A/C). No entanto, quando estas células, de ambas as linhagens foram acrescidas de IFN-γ, a adição de doses crescentes da holotoxina resultou em aumento da produção de IL-12 de maneira dose dependente (Figuras 18B/D e 19B/D). Este efeito sobre os níveis de IL-12 foi observado apenas com a adição da holotoxina, mas não de cada uma das frações separadamente (Figura 20).

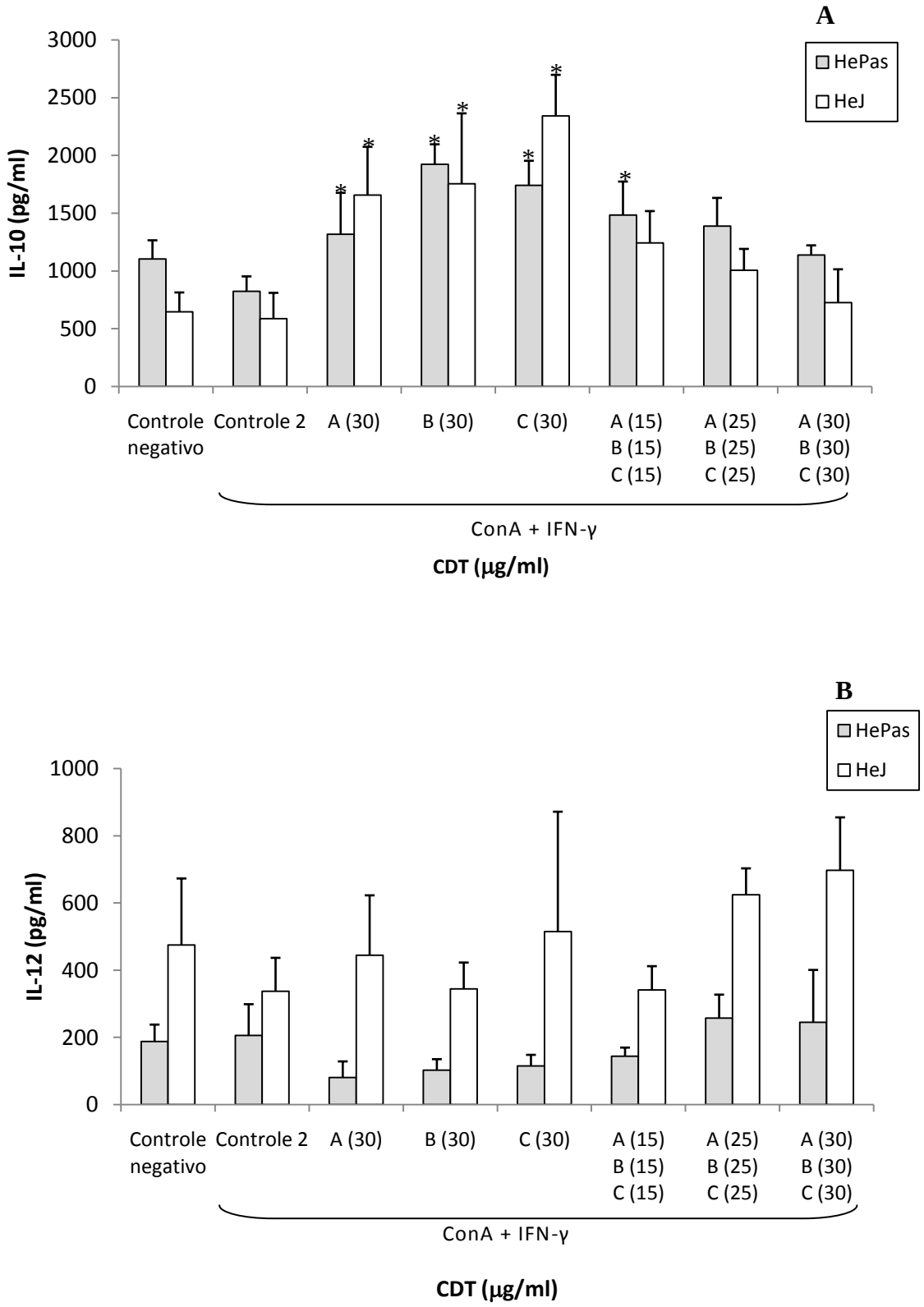


Figura 17-Produção de IL-10 (**A**) e IL-12 (**B**) pelos macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas (barras cinzas) e C3H/HeJ (barras brancas) não primados após estímulo com ConA e IFN-γ acrescido de diferentes doses de CDT ou suas subunidades. Controle negativo: somente células; Controle 2: células com ConA e IFN-γ. ConA (5 µg/ml); IFN-γ (2 µg/ml). Concentração CDT ou subunidades em µg/ml. ANOVA-Tukey, * $p<0,05$, quando comparados com controle 2 sem adição de CDT .

C3H/HePas

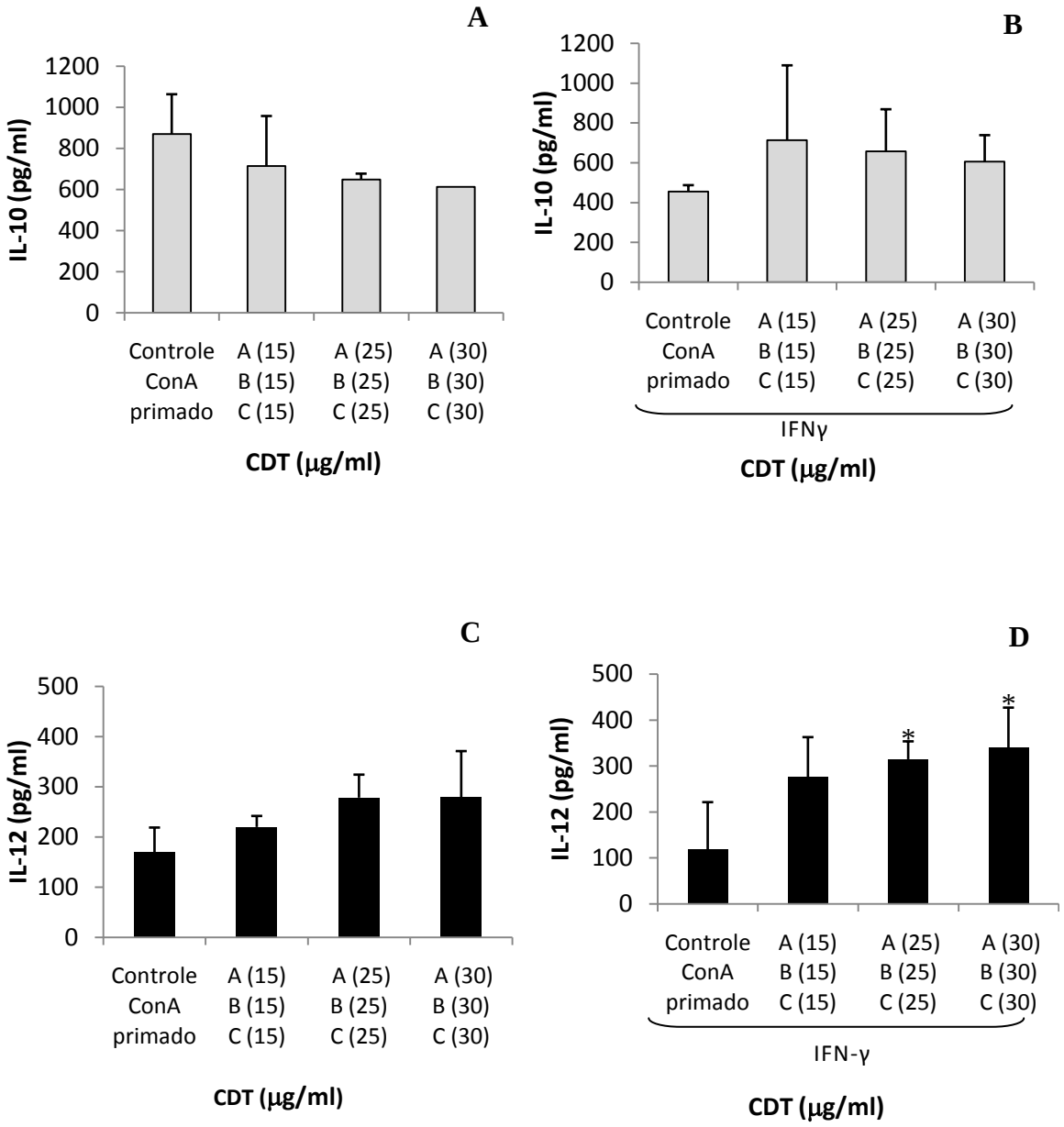


Figura 18-Produção de IL-10 (barras cinzas) e IL-12 (barras escuras) dos macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas primados com ConA (20 µg) sem adição de IFN-γ (**A** e **C**) e com IFN-γ (**B** e **D**). Controle ConA: células primadas com ConA 48 horas antes. Controle ConA + IFN: células primadas com Con A depois adicionado IFN-γ. IFN-γ (2 µg/ml). Concentração CDT em µg/ml. ANOVA- Tukey, * $p<0,05$ quando comparado com controle; # $p<0,05$ quando comparado com a menor dose da holotoxina reconstituída (15 µg/ml).

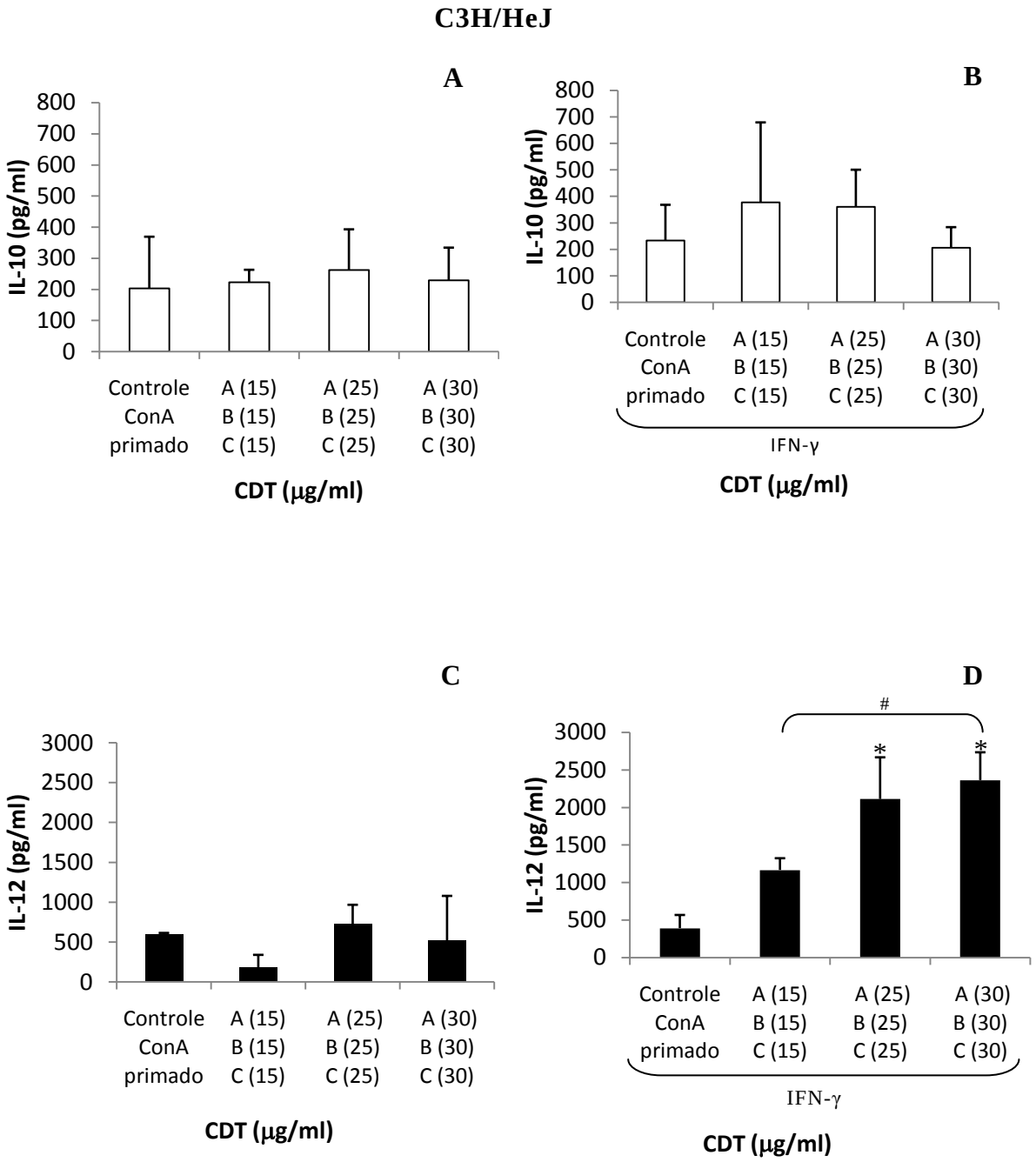


Figura 19-Produção de IL-10 (barras brancas) e IL-12 (barras escuras) dos macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HeJ primados com ConA (20 µg) sem IFN-γ (**A** e **C**) e com IFN-γ (**B** e **D**). Controle ConA: células primadas com ConA 48 horas antes. Controle ConA + IFN: células primadas com Com A depois adicionado IFN-γ. IFN-γ (2 µg/ml). Concentração CDT em µg/ml. ANOVA- Tukey, * $p<0,05$ quando comparado com controle; # $p<0,05$ quando comparado com a menor dose da holotoxina reconstituída (15 µg/ml).

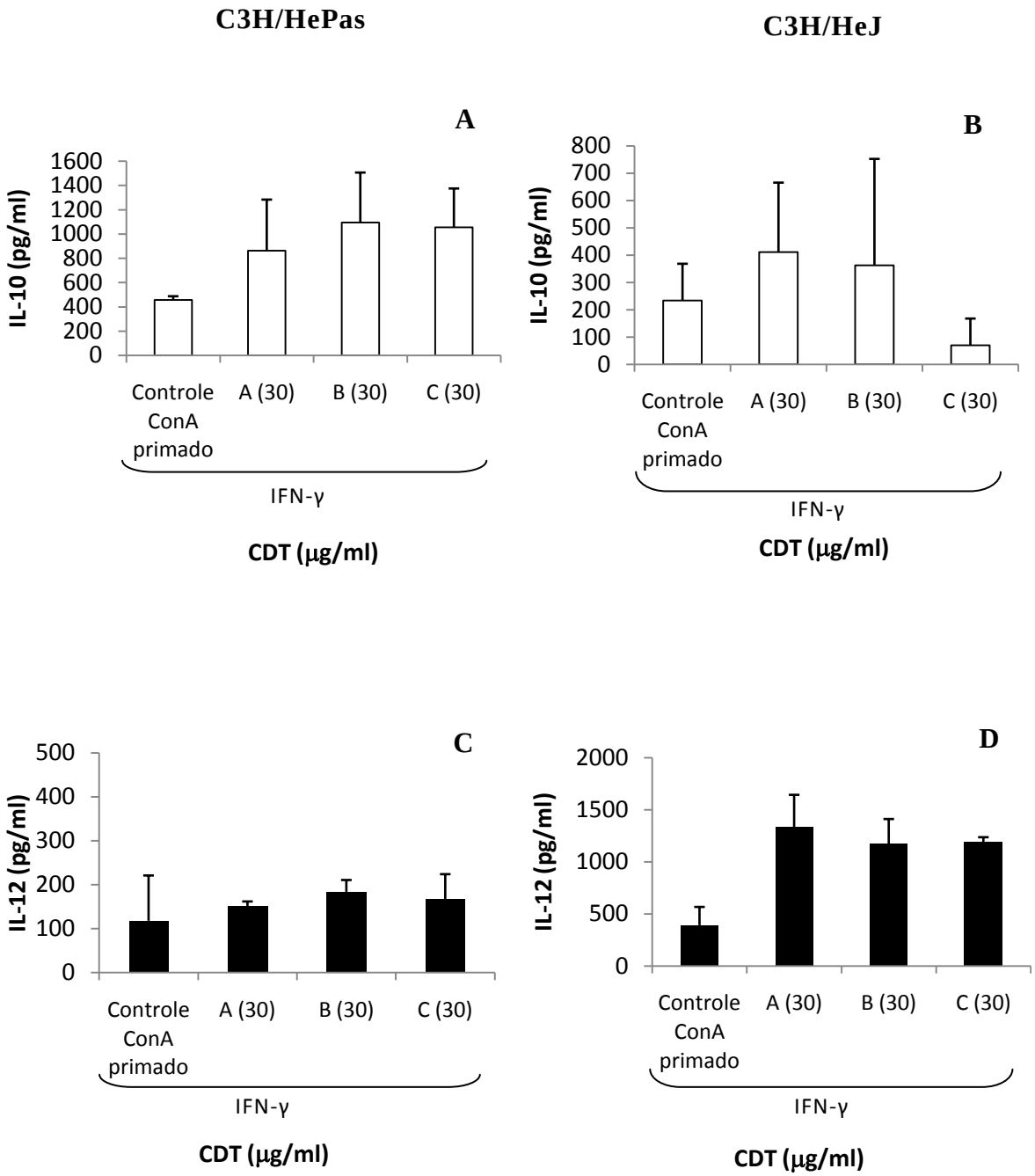


Figura 20- Produção de IL-10 (barras brancas) e IL-12 (barras escuras) por macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HeJ (**A** e **C**) e C3H/HePas (**B** e **D**) primados com ConA (20 µg) acrescidos com IFN-γ após adição de subunidades CDT. Controle ConA + IFN: células primadas com Con A depois adicionado IFN-γ. IFN-γ (2 µg/ml). Concentração CDT em µg/ml.

4.3 Fase 2- Determinação dos títulos séricos de IgG contra os sorotipos a, b e c de *A. actinomycetemcomitans* e as subunidades CDTA, CDTB e CDTC

4.3.1 Detecção de IgG contra os sorotipos de *A. actinomycetemcomitans*

Níveis séricos de IgG contra *A. actinomycetemcomitans* sorotipos a, b e c foram determinados em 80 indivíduos com diferentes condições periodontais. Foram utilizados três diferentes diluições de soro para a realização dos experimentos e estes demonstraram significante correlação entre si (correlação de Spearman, $p<0,001$). Após a correção dos valores obtidos pela mensuração da D.O. e a determinação do *cut-off* (DESHPANDE, 1996), foram considerados positivos para a presença da bactéria, aqueles soros com o valor de Fx positivos (Anexo B). Trinta e oito (47,5%) dos 80 indivíduos analisados foram soro reativos para a *A. actinomycetemcomitans*. Destes 38 indivíduos reativos, a resposta para o sorotipo b foi o mais prevalente (n=25, 31,2%), seguido pelo sorotipo c (n=16, 20,0%) e sorotipo a (n=12, 15,0%). Onze indivíduos com periodontite agressiva (n=8 para PAgL e n=3 para PAgG) responderam para 2 ou mais sorotipos. Resposta para apenas o sorotipo a foi detectada entre indivíduos saudáveis, mas não entre paciente com doença periodontal, a qual se apresentou juntamente com o sorotipo b e/ou c. Dados sobre a reatividade para os sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* estão demonstrados na tabela 2.

Tabela 2-Distribuição dos indivíduos com diferentes condições periodontais (Saudáveis, PAgL, PAgG e PC) reativos para *A. actinomycetemcomitans* (A.a) sorotipos a, b e c baseados nas análises dos valores de *cut-off* (Fx_{Aa}) após a reação de ELISA para detecção IgG contra bactéria total na diluição de soro 1:20.000.

Diagnóstico periodontal	Número de indivíduos soro reativos *A.actinomycetemcomitans* n(%)	Sorotipo a n (%)	Sorotipo b n (%)	Sorotipo c n (%)
Saudáveis n=28	7 (25,0)	3 (10,7)	1 (3,6)	3 (10,7)
PAgL§ n=24	18 (75,0)	7 (29,2)*	16 (66,7)*	6 (25,0)
PAgG§ n=11	9 (81,8)	2 (18,2)	6 (54,5)*	5 (45,4)*
PC n=17	4 (23,5)	0 (0,0)	2 (11,8)	2 (11,8)
Total N=80	38 (47,5)	12 (15,0)	25 (31,2)	16 (20,0)

§Alguns pacientes responderam positivamente para 2 ou mais sorotipos.* Diferença estatisticamente significante quando comparado com indivíduos saudáveis ($p<0,05$, teste de Fisher).

É interessante verificar que os títulos de IgG para o sorotipo b é significantemente maior em pacientes PAgL e PAgG em relação aos títulos encontrados em soros de indivíduos saudáveis (ANOVA-Tukey, $p<0,001$ e $p<0,01$, respectivamente), já para o sorotipo a e c essa diferença não é significante ($p>0,05$) (Figura 21).

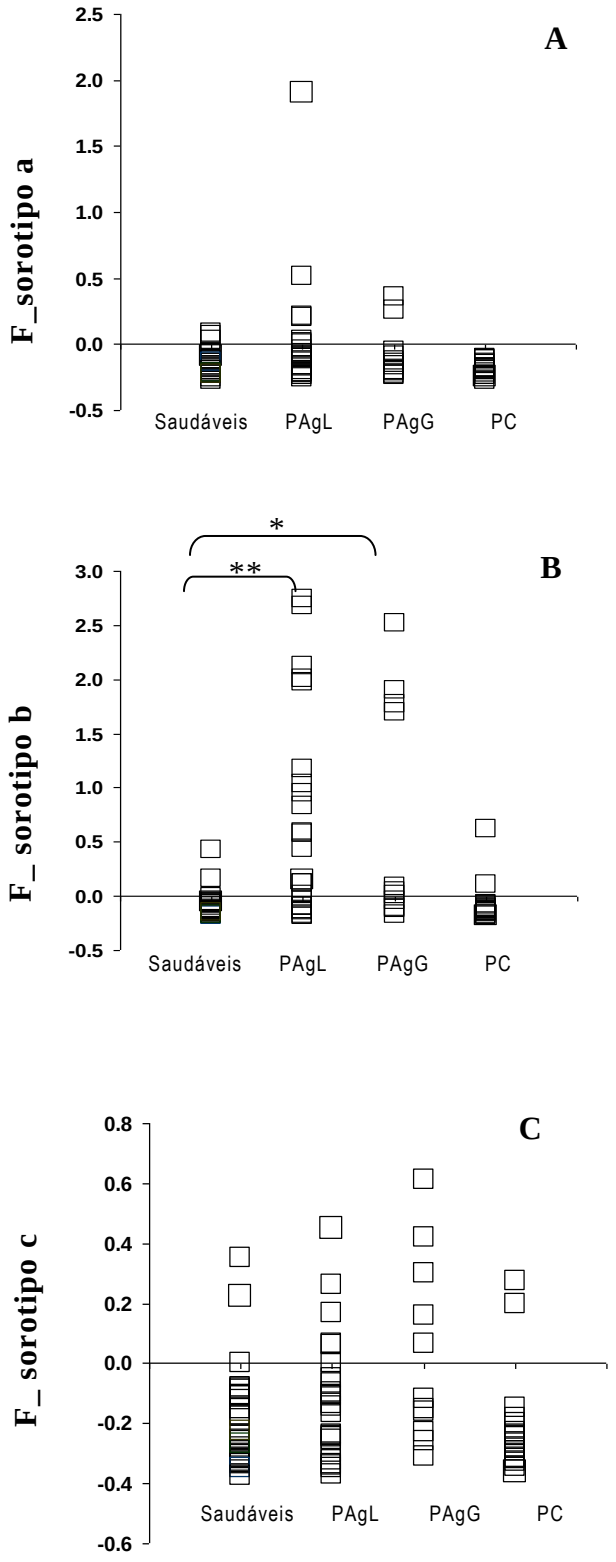


Figura 21-Distribuição dos indivíduos reativos e não reativos e os níveis de IgG. para os sorotipos a (**A**), b (**B**) e c (**C**), separados em grupos de diferentes condições periodontais (Saudáveis, PAgL, PAgG e PC). Valores D.O. corrigidos (F_sorotipo). Acima de 0, são os indivíduos considerados reativos para *A. actinomycetemcomitans*. ANOVA-Tukey, * $p < 0,05$ e ** $p<0,01$ quando comparados com indivíduos saudáveis.

4.3.2 Detecção de IgG contra CDTA, CDTB e CDTC

Entre 80 indivíduos analisados para determinação da resposta imune IgG contra CDTA, CDTB e CDTC, o teste de correlação de Spearman revelou uma correlação linear para as diluições do soro 1:50 e 1:150 (CDTA R=0,91, p<0,001; CDTB, R=0,90, p<0,001; CDTC R=0,85, p<0,001). Os dados de F_CDT estão apresentados no anexo C para IgG contra CDTA, CDTB e CDTC, nas diluições de soro 1:150.

Dados da reatividade dos soros dos indivíduos analisados estão na tabela 3 e figura 22. Todos os indivíduos PAgG foram responsivos para a CDTC, por outro lado, os indivíduos PC foram negativos para a presença de anticorpos para a CDTC e apenas 2 (8,3%) indivíduos PAgL forma positivos. Um maior número de soros de indivíduos com PC foi considerado reativo para a CDTB do que de outros grupos.

Tabela 3-Distrubuição dos indivíduos com diferentes condições periodontais (periodontalmente saudáveis, PAgL, PAgG e PC) classificados como soro reativos para a CDTA, CDTB e CDTC, baseados nos níveis de *cut-off* para reatividade (F_CDT) obtidos por ELISA com diluição de soro de 1:150.

Diagnóstico periodontal	CDTA	CDTB	CDTC
	Reatividade n (%)	Reatividade n (%)	Reatividade n (%)
Saudáveis n=28	9 (32,1)	8 (28,6)	7 (25,0)
PAgL n=24	8 (33,3)	9 (37,5)	2 (8,3)
PAgG n=11	5 (45,4)	5 (45,4)	11 (100)*
PC n=17	7 (41,2)	12 (70,6)*	0 (0,0)*

*Diferença estatisticamente significante quando comparados com indivíduos saudáveis (p<0,05, teste de Fisher).

Os dados de resposta às CDTs foram também analisados em relação à condição periodontal dos grupos de indivíduos separadamente (Saudáveis, PAgG, PAgL e PC) e estão representados na figura 22. Os níveis de IgG contra a CDTA e CDTB não diferiram conforme o diagnóstico periodontal. Apenas contra a CDTC foi verificada diferença estatisticamente significante entre o grupo dos saudáveis com o grupo PC (ANOVA, $p<0,01$) e PAgG (ANOVA, $p<0,05$). Houve correlação entre as respostas às subunidades CDT para soros de indivíduos saudáveis (Correlação de Spearman, CDTA x CDTB, $R= 0,87$, $p< 0,0001$; CDTA x CDTC, $R= 0,61$, $p= 0,0005$; CDTB x CDTC, $R= 0,47$, $p= 0,01$) e para indivíduos com diagnóstico de periodontite (CDTA x CDTB, $R=0.87$, $p< 0.0001$; CDTA x CDTC, $R=0.33$, $p= 0.01$).

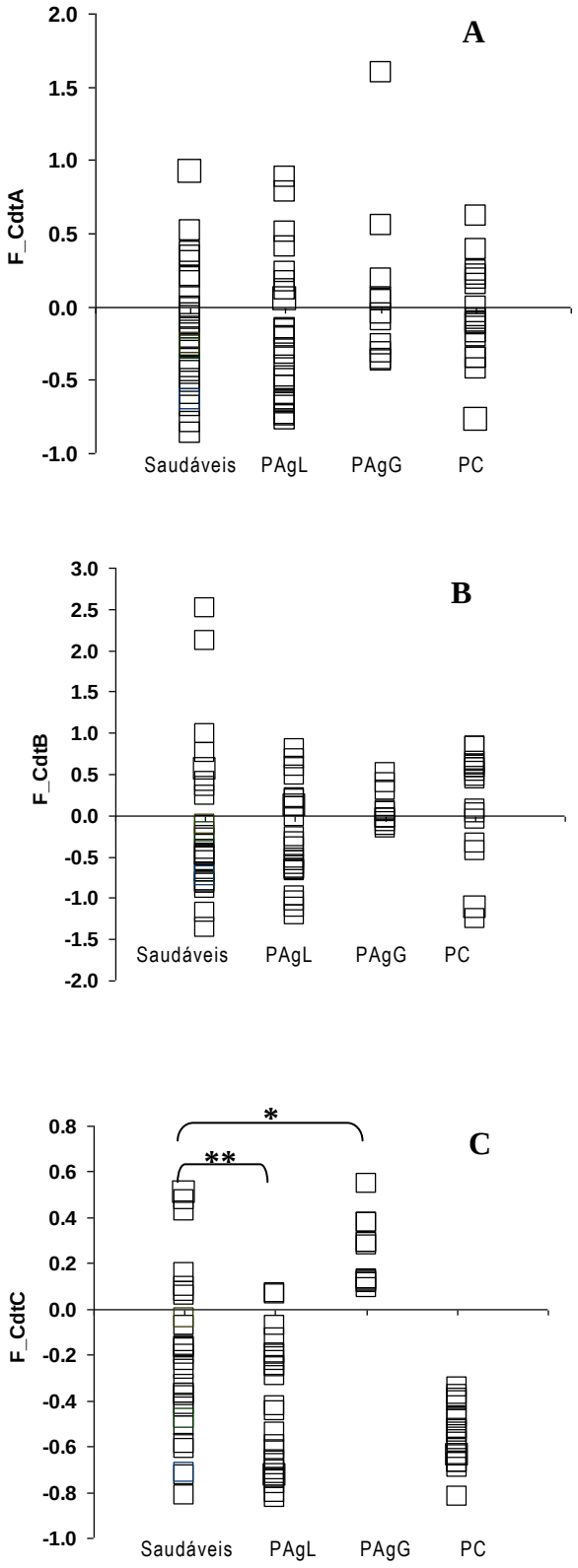


Figura 22-Distribuição dos indivíduos reativos e não reativos e os níveis de IgG. para a CDTA (**A**), CDTB (**B**) e CDTC (**C**), separados em grupos de diferentes condições periodontais (Saudáveis, PAgL, PAgG e PC). Valores de absorbância corrigidos (F_CDT)Acima de 0, são os indivíduos considerados reativos ANOVA- Tukey, * $p<0,05$ e ** $p<0,01$.

4.3.3 Correlação entre os níveis de IgG contra os sorotipos de *A. actinomycetemcomitans*, contra as subunidades CDT e contra OMP29 e OMP100

Uma vez detectados os níveis de IgG para os diferentes sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* e das subunidades CDT, em soros de indivíduos com diferentes condições periodontais, foram realizados correlações entre eles.

Apesar da alta prevalência de soro reativos para *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b em soros de pacientes com PAgL, não houve correlação entre os níveis de IgG para o sorotipo b e as subunidades CDT [CdtA (R= 0,30, p= 0,07), CdtB (R= 0,06, p= 0,07) and CdtC (R= -0,10, p= 0,53)]. Já nos PAgG foram observados correlações entre a CDTC e resposta para o sorotipo c (R=0,85, p=0,001).

Em estudo realizado anteriormente (BRUNHEIRA, 2006), verificou-se que soros destes mesmos indivíduos estudados com diagnóstico de PAgL e PAgG exibiram maiores títulos de anticorpos IgG contra as OMP100 e OMP29 de *A. actinomycetemcomitans* do que indivíduos com PC e saudáveis. Por isso, analisamos também a correlação entre os níveis de IgG contra estes antígenos e contra os sorotipos da bactéria e as CDTs. Foi observada uma fraca, porém significante correlação entre a resposta contra o sorotipo b e a contra OMP100 (R= 0,41, p=0,047) em indivíduos PAgL. Entretanto, não foi verificada correlação entre a resposta às OMPs e os sorotipos em indivíduos PAgG. Não foi observada nenhuma correlação estatisticamente significante entre a resposta às proteínas de membrana externa e as CDTs.

4.3.4 Análise dos dados obtidos pela contagem de *A. actinomycetemcomitans* dos indivíduos com diagnóstico PAgG

Como foi verificada correlação entre a resposta de IgG ao sorotipo c de *A. actinomycetemcomitans* e resposta a CDTC, porém não com a resposta contra as OMPs em indivíduos PAgG, apesar dos altos títulos encontrados nestes pacientes, consideramos importante avaliar se os níveis de anticorpos IgG encontrados se correlacionariam com os níveis subgengivais de *A.*

actinomycetemcomitans. Estes dados foram obtidos em estudo recente de Faveri et al (2009) empregando a técnica de hibridização DNA-DNA.

A análise microbiológica foi feita em 99 amostras de placa subgengival obtidas de 11 indivíduos com diagnóstico de PAgG (FAVERI et al., 2008). A colonização subgengival por *A. actinomycetemcomitans* foi demonstrada nos 11 indivíduos, utilizando como padrões DNAs de *A. actinomycetemcomitans* sorotipos a e b (Tabela 4). Os níveis subgengivais de *A. actinomycetemcomitans* se correlacionaram com a reatividade de IgG contra sorotipo a (R=0,75, p=0,01) e sorotipo b (R=0,70, p=0,049), mas não para o sorotipo c. Estes resultados seriam esperados, uma vez que não foi utilizado como sonda o DNA deste sorotipo para a detecção da bactéria. Não houve correlação entre a colonização por *A. actinomycetemcomitans* nos sítios subgengivais e a resposta de IgG para qualquer subunidade CDT [CdtA (R= 0,34; p= 0,29), CdtB (R= 0,30, p=0,35) e CdtC (R= 0,45, p= 0,16)].

4.3.5 Atividade neutralizadora do soro

A capacidade neutralizadora da atividade CDT foi testada usando soro de cinco indivíduos PAgG e soro de um paciente saudável não reativo contra *A. actinomycetemcomitans* ou contra as subunidades CDT. A adição de CDT promoveu redução da viabilidade celular em 18,5%, sem a adição de soro humano (controle negativo), sendo este considerado 0% de inibição da atividade CDT. A adição de soro do indivíduo saudável resultou em um efeito neutralizador de 61,2% na atividade CDT. A redução na atividade CDT promovida pelo soro de indivíduos PAgG variou entre 73 a 100% (Tabela 4).

Tabela 4-Análise da atividade neutralizadora em células CHO-9 contra a holotoxina CDT em indivíduos PAgG e um saudável como controle comparados com controle negativo (CDT + 10% Soro Fetal Bovino). Reatividade para as subunidades CDT e os sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* foram dados em valores de F_x (valores positivos foram considerados reativos e os negativos como não-reativos). Número de células de A.a representa a média do número de células de *A. actinomycetemcomitans* determinado em nove sítios por indivíduo.

	% inibição atividade CDT	F_CdtA	F_CdtB	F_CdtC	Numero de células de *A.a*	F_sorotipo a	F_sorotipo b	F_sorotipo c
Controle neg	0	-	-	-	-	-	-	-
Saudável	61,2	-0,267	-0,347	-0,612	-	-0,327	-0,230	-0,149
PAgG1	-	0,045	-0,157	0,094	0	-0,197	1,906	-0,259
PAgG 2	-	-0,361	0,038	0,375	5.714	-0,207	-0,120	0,614
PAgG 3	97,9	0,185	0,064	0,281	288.089	-0,163	1,701	-0,117
PAgG 4	72,7	0,557	0,397	0,290	8.889	-0,129	0,008	0,299
PAgG 5	77,4	-0,053	0,300	0,376	1.402.222	0,361	2,518	0,418
PAgG 6	83,4	1,594	-0,037	0,289	82.222	-0,086	0,085	-0,151
PAgG 7	-	-0,260	0,512	0,114	36.667	-0,238	-0,109	-0,159
PAgG 8	-	-0,097	-0,028	0,126	372.857	-0,050	1,773	-0,230
PAgG 9	100,0	-0,369	-0,119	0,120	0	-0,222	-0,166	-0,308
PAgG10	-	0,062	-0,694	0,696	125.556	0,263	0,039	0,160
PAgG11	-	-0,314	-0,638	0,278	74.444	-0,143	-0,044	0,068

5 DISCUSSÃO

Certos fatores de virulência produzidos por microrganismos patogênicos podem levar a modulação do sistema imune, dificultando a eliminação do patógeno e assim perpetuando a infecção.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans é um dos principais patógenos da doença periodontal agressiva de forma localizada (PAgL) e possui vários mecanismos que podem interferir na resposta imune como: a resistência à opsonização, a produção de leucotoxina e da toxina distensora citoletal (ZAMBON et al., 1985; HENDERSON et al., 2002; FINE et al., 2006).

A CDT induz a parada do ciclo celular na fase G2 em uma variedade de células proliferativas, incluindo células epiteliais, fibroblastos do ligamento periodontal e linfócitos (SMITH e BAYLES, 2006). Apesar da sensibilidade à CDT exibida por linfócitos T proliferativos (SHENKER et al, 2001), ainda não é clara como a ação da toxina nestas células poderia contribuir na persistência da infecção por *A. actinomycetemcomitans*, visto que a maioria dos linfócitos infiltrados no tecido gengival não estão proliferando ativamente (RABIN et al., 2009). Células não proliferativas do sistema imune podem também serem alvos da atividade CDT. Estudos realizados com a toxina purificada de *H. ducreyi* e *C. jejuni* demonstraram que a CDT induz apoptose em células dendríticas e macrófagos (HYCKEY et al., 2005; LI et al., 2001; SVENSSON et al., 2001; XU et al., 2004). A CDT de *A. actinomycetemcomitans* é capaz de causar apoptose de linfócitos T, monócitos humanos e monócitos de linhagem (WISING et al., 2005; RABIN et al., 2009).

A subunidade funcional da CDT, CDTB, apresenta homologia com *DNAse*I de mamíferos, podendo causar a clivagem e dano ao DNA das células do hospedeiro (ELWEEL et al., 2000; NESIC et al., 2004). Por outro lado, esta pode exibir atividade fosfatase, induzindo a parada do ciclo celular em células proliferativas mediada pela desfosforilação de Cdc2, um regulador negativo da mitose (ESCALAS et al., 2000). Além disso, foi proposto que a CDTB possui atividade de fosfatase fosfatidilinositol (PI)-3,4,5-trifosfato, levando a parada do ciclo celular na fase G2 (SHENKER et al., 2007). Estudos recentes demonstram atividades distintas da CDT, em que células monocíticas de linhagem não proliferativas sofreram apoptose independente da atividade fosfatase, enquanto

que a atividade CDT em células proliferativas foi resultado tanto de ação fosfatase como de *DNAse* (RABIN et al., 2009).

No presente estudo, foi analisada a atividade da CDT sobre células de linhagem epitelial e macrofágicas e verificados os títulos de IgG sérica contra a toxina em pacientes com diversas condições periodontais. Para tanto, foram obtidas as subunidades CDT recombinantes purificadas e a holotoxina reconstituída. A atividade tóxica da CDT foi determinada sobre células epiteliais gengivais (OBA-9) e macrófagos Raw 264.7, além de células epiteliais CHO-9, cuja suscetibilidade a CDT já havia sido demonstrada (MAO e DIRIENZO, 2002). Como estas são células proliferativas, a citotoxicidade foi determinada pela determinação do número de UFC sobreviventes de cada uma das linhagens celulares. Como esperado, a toxina causou a morte de células CHO-9 de maneira dose dependente (Figura 5). Além disso, foi observada que a CDT não reconstituída e as subunidades separadas não exerceram efeito citóxico pronunciado como a holotoxina reconstituída (Figuras 4 e 5), demonstrando a importância da conformação estrutural com as três subunidades para a recuperação de sua função.

As células originadas de epitélio gengival humano OBA-9 também se mostraram sensíveis à holotoxina (Figura 6). Embora os resultados *in vitro* não possam ser totalmente extrapolados para as condições *in vivo*, a citotoxicidade de uma toxina produzida por um patógeno periodontal sobre as células OBA-9 sugere que a CDT, juntamente com outros fatores bacterianos, auxiliaria na destruição da barreira epitelial em casos de periodontites associadas a *A. actinomycetemcomitans*. Assim, a CDT teria efeito direto na destruição dos tecidos periodontais, agindo sobre fibroblastos do ligamento periodontal e células do cemento (BELIBASAKIS et al., 2004), mas também sobre as células do epitélio gengival.

A atividade citotóxica em macrófagos da linhagem Raw 264.7, determinada pelo cálculo de células sobreviventes, demonstra a capacidade da CDT em bloquear o ciclo celular também nestas células (Figura 7). No entanto, macrófagos são originados de monócitos que sofrem diferenciação ao entrarem nos tecidos, não sendo capazes de se multiplicar. Visando analisar a citotoxicidade da CDT independente do bloqueio no ciclo celular, foram também utilizados macrófagos peritoneais de camundongo, o que se aproximaria melhor

do que ocorre na doença. Macrófagos e células dendríticas não proliferativas compõem a maioria dos leucócitos nos tecidos e são algumas das primeiras células imunes presentes no sítio de infecção por *A. actinomycetemcomitans* (HOURI-HADDAD et al., 2007). A viabilidade destas células foi determinada no ensaio com MTT, onde a redução do sal tetrazólico em formazan ocorre em células metabolicamente ativas por ação da redutase mitocondrial (MOSMANN, 1983).

Além de serem células fagocitárias e apresentadoras profissionais de antígenos (APCs), os macrófagos são capazes de secretar vários tipos de citocinas, quimiocinas e radicais reativos (MARTINEZ et al., 2008). Estas células têm papel indispensável na resposta imune, atuando tanto na resposta inata como na adquirida. Os macrófagos acumulam-se em lesões periodontais, levando a uma resposta inflamatória juntamente com os neutrófilos, linfócitos T e B, que visa o controle da infecção, mas também resulta em destruição tecidual (GAMONAL et al., 2001). Assim, para testar a atividade da CDT na modulação do sistema imune, foram utilizados a princípio, macrófagos imortalizados da linhagem Raw 264.7. A seguir, a atividade CDT foi determinada sobre macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ, este último deficiente em TLR4, que os torna hiporresponsivos para LPS (STUEHR e MARLETTA, 1987; DONG et al., 1993; KAISHO e AKIRA, 2002).

O ensaio de viabilidade com MTT sobre macrófagos Raw 264.7 ativados com LPS/ IFN-γ demonstrou que a adição da CDT reconstituída ou das subunidades CDT (exceto na dose de 15 µg/ml de cada subunidade) não promoveu a redução da viabilidade em relação ao controle contendo apenas LPS/ IFN-γ (Figura 8B). Pórem, quando foi analisada a citoxidade em células não ativadas por LPS/ IFN-γ, a adição da toxina nas duas menores doses empregadas ou das subunidades resultou em redução da viabilidade, o que não foi observado quando adicionadas as duas doses mais altas de CDT (Figura 9B).

O mesmo ensaio foi empregado para análise da viabilidade de macrófagos peritoneais. Neste ensaio em que as células receberam a adição de LPS/ IFN-γ, não houve redução da viabilidade celular significante em nenhuma das linhagens murínicas empregadas (Figura 12B).

Nas células peritoneais de camudongos selvagem C3H/HePas ativadas com Con A, com e sem adição de IFN-γ, a redução da viabilidade promovida pela adição de CDT não foi estatisticamente significante, quando estes níveis foram comparados aos níveis de viabilidade dos controles (Figuras 14D e 16D). Diferentemente, a adição de CDT a células peritoneais de camundongos C3H/HeJ, não-primados ou primados com ConA, na presença de IFN-γ, resultou em redução da viabilidade quando comparados aos controles. Nesta linhagem, houve uma redução de aproximadamente 45% das células após a incubação com as subunidades CDT ou com a toxina na concentração de 30 µg/ml de cada subunidade (Figuras 15D e 16C), indicando maior suscetibilidade à CDT destas células ativadas por IFN-γ e ConA.

Deve ser ressaltado o fato de as subunidades CDT terem apresentado efeito citotóxico em alguns casos, pois nestas não ocorre o transporte da toxina para o interior das células alvo. Outro ponto a ser considerado é que o efeito da CDT reconstituída sobre a viabilidade celular demonstrada nos ensaios, não pode ser atribuído somente à holotoxina, pois a mistura das subunidades e a posterior reconstituição poderiam resultar em uma parcela das subunidades ainda livres.

A redução da viabilidade das células peritoneais promovida pela CDT pode não ser restrita aos macrófagos presentes. As células peritoneais utilizadas representam aproximadamente 60-80% de macrófagos, sendo o restante composto por linfócitos, células PMNs e mastócitos (FERNANDES et al., 2008). Certas células poderiam ser mais suscetíveis à ação da toxina e/ou das subunidades com concomitante adição de IFN-γ, como por exemplo, os linfócitos T, cuja hipersensibilidade à CDT foi demonstrada em células T da linhagem Jurkat por interrupção do ciclo celular e apoptose (GELFANOVA et al., 1999; SHENKER et al., 2001; SHENKER et al. 2006).

O emprego de lisados bacterianos brutos contendo CDT recombinante, em estudo prévio, sugeriu que CDT seria capaz de interferir na produção de NO por macrófagos peritoneais (FERNANDES et al., 2008). Mas, naquele estudo, devido ao emprego de lisados, ficaria impossível determinar o papel dos diferentes constituintes na indução da atividade macrofágica. No presente estudo determinamos que CDT não interfere na viabilidade de macrófagos Raw 264.7 ativados com LPS/ IFN-γ mesmo quando as doses mais altas da toxina foram empregadas e pode agir apenas parcialmente na viabilidade de macrófagos

peritoneais da linhagem C3H/HePas eC3/HeJ, como demonstrado em alguns ensaios (Figuras 8 a 15). Estes dados diferem dos observados por Rabin et al. (2009), pois estes autores verificaram que a CDT foi capaz de causar apoptose em linhagem de células monocíticas U937, que quando ativadas apresentam características de macrófagos. Mas, os próprios autores ressaltam que os dados deveriam ser confirmados em macrófagos. Outro fator a ser abordado é a concentração da toxina empregada, em relação ao número de células alvo. Nos ensaios em que foi determinada a viabilidade células pelo cáculo do número de sobreviventes capazes de gerar uma colônia foi empregada uma maior proporção de toxina /célula. O efeito citotóxico poderia também ser dose dependente, no entanto, os dados apresentados na figuras 8, 9 12, 14 e 15 (com exceção de 15D) demonstram que a viabilidade celular de macrófagos ativados foi maior empregando-se doses maiores de CDT do que nas doses menores. Os níveis de CDT nos tecidos não foram determinados e possivelmente estes níveis variam de acordo com os níveis de colonização subgengival entre os pacientes, ou com a expressão e atividade de CDT pela cepa infectante (FABRIS et al., 2002; KAWAMOTO, 2005). A observação que *Aa*CDT é capaz de estimular a síntese de IL-1β, IL-6 e IL-8 por monócitos periféricos humanos (AKIFUSA et al., 2001) também contribui com a observação do presente estudo, sugerindo a manutenção da viabilidade celular após o contato com CDT nas condições empregadas.

Assim, formulamos a hipótese de que CDT seria capaz de interferir na atividade macrofágica, mesmo sem interferir na viabilidade destas células. A modulação da atividade de macrófagos pode ser uma estratégia para assegurar a persistência de um patógeno no hospedeiro. Em alguns casos de doenças parasitárias ocorre a ativação alternativa de macrófagos, promovendo a sobrevivência e a proliferação do parasita, embora ocorra uma limitação do dano tecidual causado pela excessiva inflamação (RAES et al., 2007). Ensaios em animais experimentais demonstraram que *C. jejuni* deficiente no gene *cdtB* foi menos invasivo em tecidos de camundongo do que a cepa selvagem (FOX et al., 2004), promovendo um quadro inflamatório mais atenuado no animal quando comparada com a cepa selvagem (PURDY et al., 2000). Outras evidências como a demonstração de que CDT estaria envolvida com perpetuação da infecção pela

amostra produtora (GE et al., 2005), indicam que a atividade microbicida estaria comprometida em infecções por cepas produtoras de CDT.

Os ensaios de determinação da atividade macrófagica após o contato com CDT foram realizados primeiramente em macrófagos Raw 264.7 ativados com LPS/ IFN-γ sendo determinada, nestas células, a produção de NO e das citocinas IL-12 e IL-10. A ativação de macrófagos por LPS/ IFN-γ resulta em células M1 que apresentam maior produção de citocinas proinflamatórias, aumento na função endocítica e maior atividade microbicida (ADAMS, 1989). Como esperado, no presente estudo, a ativação por LPS/ IFN-γ resultou em produção de NO (controle da Figura 8A), pois a ativação resulta na indução da transcrição dos genes relacionados a via do NF-κB e STAT1, levando à consequente produção de iNOs e seus produtos (MARTINEZ et al., 2008). A adição das subunidades da toxina e de doses mais baixas da holotoxina resultou em maior produção de NO do que observada no controle somente com adição de LPS/ IFN-γ. Paradoxalmente, a adição de doses crescentes da holotoxina resultou em redução dos níveis de NO produzidos pelos macrófagos ativados por LPS/ IFN-γ. Esta redução na produção de NO pela CDT foi associada à maior viabilidade destas células, demonstrando que a redução da produção de NO não era devida à morte das células (Figuras 8A e 8B). Ao contrário, altas concentrações de NO podem levar a morte das próprias células produtoras, como demonstrado em estudos em que a ativação de células Raw 264.7 com altas doses de LPS/ IFN-γ resultou em apoptose celular (GOTOH e MORI, 1999). Assim, o efeito inibitório na produção de NO promovido pela atividade CDT nas doses mais altas empregadas (30 µg/ml, principalmente) resultou também em manutenção da viabilidade celular.

Resultados semelhantes foram obtidos com a adição de CDT às células Raw 264.7, sem estímulo com LPS/ IFN-γ (Figura 9A e 9B). Estes dados sugerem que, a produção de NO induzida pelas subunidades CDT e pela menor concentração da toxina, em macrófagos Raw 264.7, não é dependente de IFN-γ. Associado a isso, a indução da produção de NO pelas subunidades demonstra que esta indução independe da entrada da CDTB na célula alvo e sugerem que na toxina reconstituída podem restar subunidades livres. Também indicam que a holotoxina reconstituída é capaz de inibir a produção de NO, induzida por LPS/ IFN-γ e/ou as subunidades CDT.

Nos tecidos periodontais, bem como em outros tecidos infectados por microrganismos ocorre ativação de macrófagos devido aos produtos bacterianos presentes como LPS e pela produção de IFN-γ. Em tecidos gengivais acometidos por periodontite foi demonstrada a presença de títulos de iNOS mais altos do que em tecidos saudáveis (LAPPIN et al., 2000). Assim, subunidades CDT poderiam ser consideradas mais um possível fator a induzir esta ativação. Por outro lado, nos tecidos periodontais, não é esperada a presença das subunidades separadamente, mas apenas a formação da toxina reconstituída, pois os genes das subunidades CDT estão codificados em um único operon que resulta em um único transcrito (MAYER et al., 1999; SHENKER et al., 2000).

Com o intuito de verificar se o padrão de inibição da produção de NO promovido pela CDT em macrófagos de linhagem seria observado também em células não proliferativas, foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ.

De maneira análoga a observada em macrófagos Raw 264.7, a adição das subunidades CDT (diferença significante somente com adição de CDTB) em macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HePas ativados com LPS/ IFN-γ resultou em aumento da produção de NO (Figura 12). No entanto, embora tenha sido observada redução da produção de NO pela adição de doses crescentes da holotoxina sem perda da viabilidade celular, este efeito foi discreto e não significante.

Como esperado, macrófagos peritoneais de camundongos C3H/HeJ, não responderam ao estímulo com LPS, mantendo baixos os níveis de NO após a sua adição. Porém a adição de IFN-γ com LPS induziu a produção de NO nestas células. Como demonstrado previamente por Wang et al. (1999), elevadas doses de LPS associadas ao IFN-γ, levam a produção de NO por macrófagos peritoneais desta linhagem murínica. O efeito das subunidades CDT sobre macrófagos observado em vários ensaios, induzindo a produção de NO não pode ser atribuído a resquícios de LPS presentes nas suspensões das subunidades CDT purificadas, visto que a adição de grandes doses das subunidades não resultou em aumento na produção de NO por células peritoneais dos animais deficientes em TLR-4 além do observado após estímulo com LPS/ IFN-γ. Além disso, a adição da holotoxina na maior dose empregada resultou em significante redução na produção de NO em comparação à menor dose da toxina empregada, ao contrário

do aumento que seria esperado se houvesse presença de LPS. O método de purificação empregado para as subunidades CDT já havia sido anteriormente utilizado por Mao e DiRienzo (2002). Esta metodologia é amplamente empregada para purificação de proteínas apresentando a cauda de histidina, e os estudos não relatam contaminação por LPS nas suspensões obtidas. No entanto, para excluir essa possibilidade de contaminação, foram realizados ensaios estimulando células de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ com Concanvalina A (Figura 12).

ConA é uma lectina produzida pela planta *Canavalia ensiformis* e é capaz de ativar linfócitos Th1 a produzirem IFN-γ, consequentemente levando à ativação de macrófagos pela via IFN-γ dependente (RODRIGUES et al., 2003; SMITH e GOLDMAN, 1972). No presente estudo foram utilizados dois modelos. No primeiro, as células peritoneais foram ativadas por ConA, *in vitro*, ao mesmo tempo em que foi realizada a adição da CDT (células não primadas); no segundo modelo, as células peritoneais de camundongos foram primadas com ConA *in vivo*, 48 horas antes da obtenção das células peritoneais e da adição da CDT *in vitro*, para empregar um modelo de inflamação pré-existente.

Nos experimentos com camundongos C3H/HeJ houve produção de NO induzida pela adição de ConA/ IFN-γ (controle) e não houve difereça estatisticamente significante da produção de NO quando doses mais altas de CDT foram empregadas, onde teríamos maior quantidade de contaminantes (Figuras 13 e 15B).

A análise da viabilidade celular e produção de NO pelas células peritoneais de camundongos C3H/HePas demonstrou que houve maior produção de NO quando adicionadas as subunidades CDT e doses mais baixas da toxina, enquanto que a concentração mais alta da holotoxina levou a uma inibição da produção de NO, apesar desta redução não ter sido estatisticamente significante (Figuras 13, 15 e 16). Nas células não primadas com ConA de camundongos não houve a perda de viabilidade celular, exceto quando adicionada a subunidade CDTC. É interessante notar que a adição desta subunidade resultou em maior produção de NO, indicando que altas doses de NO estariam influenciando negativamente a viabilidade celular.

As células de camundongos C3H/HeJ apresentaram um perfil semelhante ao dos C3H/HePas com a inibição da produção de NO quando a dose mais alta da toxina foi empregada. No entanto, nesta dose da toxina, houve redução de

viabilidade nestas células, diferindo do observado em células da linhagem C3H/HePas (Figura 13). Estes resultados sugerem que outra via além da TLR4, como a TLR2, estaria induzindo a produção de NO pelos macrófagos após contato com CDT. Estudos indicam que *A. actinomycetemcomitans* poderia estimular tanto a via TLR4 como a TLR2, apesar desta última ser menos estimulada que a primeira (KIKKERT et al., 2007).

Células peritoneais primadas de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ, sem a adição de IFN-γ (Figuras 14A e 15A), apresentaram produção de NO, porém esta foi maior com a adição de IFN-γ (Figuras 14B e 15B). O IFN-γ é o principal ativador de macrófagos e é produzido pelas células Th1, sendo essencial na imunidade celular contra microrganismos intracelulares, levando a um aumento da capacidade fagocítica e produção de NO (ABBAS et al.2003; STUER e MARLETTA, 1987). Em infecções periodontais, altos níveis de IFN-γ estão associados a progressão da lesão ou a formas severas da doença, podendo levar ao desenvolvimento de reação inflamatória e reabsorção óssea (GARLET et al., 2003; TENG et al., 2005). No modelo experimental proposto, em células primadas com ConA ocorre a indução da produção de IFN-γ por lifócitos T (SMITH e GOLDMAN, 1972). A adição complementar de IFN-γ nos ensaios *in vitro* com células peritoneais primadas, é justificada, para que níveis máximos de ativação dos macrófagos sejam obtidos, visto que houve maior produção de NO neste ensaio do que sem a adição de IFN-γ (Figuras 14 e 15). A adição de CDT as células peritoneais primadas adicionadas ou não de IFN-γ resultou em diminuição na produção de NO de maneira dose dependente (Figuras 14 e 15).

É interessante notar que a adição de IFN-γ a células peritoneais primadas de camundongos CH3/HeJ resulta em maior produção de NO e perda de viabilidade celular (dados não demonstrados). A adição de CDT a estas células submetidas a maiores doses de IFN-γ, mas não sem a adição de IFN-γ, resulta em redução adicional de viabilidade, associada à redução da produção de NO, diferindo dos resultados dos demais ensaios (Figura 14). Os dados sugerem então, que nestas condições, a redução não é decorrente de excesso de NO, mas possivelmente devido à apoptose promovida por CDT, como demonstrada em células monocíticas não proliferativas por Rabin et al (2009).

Assim, os resultados sugerem que a produção de CDT por *A. actinomycetemcomitans* inibe a produção de NO e consequentemente a capacidade microbicida de macrófagos, dificultando a eliminação do agente infeccioso por macrófagos e favorecendo a perpetuação da bactéria na cavidade oral. A redução na produção de NO poderia colaborar com a progressão da periodontite não somente por diminuir a capacidade do hospedeiro em controlar a infecção, mas também por interferir na homeostase óssea. A deficiência na produção de iNOS ou a inibição de NO podem aceleram a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea *in vivo* e *in vitro*, diminuir a massa óssea normal, exacerbar a destruição óssea em modelo de artrite e interferir com a consolidação de fraturas (DIWAN et al., 2000; MCCARTNEY- FRANCIS et al., 2001; VEIHELMANN et al., 2001). Apesar do relato que os números de osteoclastos no periodonto são menores em camundongos iNOS-/- do que na linhagem selvagem em resposta a estímulo com *P. gingivalis* (GYURKO et al., 2005), estudo de periodontite periapical experimental em camundongos demonstrou que a linhagem deficiente em iNOS apresenta lesões maiores, com maior número de osteoclastos e estas são associadas a maior expressão de RANK (fator ativador do receptor de NF-κB) e redução da expressão de osteoprotogerina (OPG) (FUKADA et al., 2008). Assim, a inibição da produção de NO por CDT estaria não somente favorecendo a perpetuação do agente produtor, mas favorencendo a progressão da periodontite também por afetar a homeostase óssea, favorecendo a reabsorção.

Para determinar se CDT estaria interferindo em outras funções dos macrófagos, foi verificada a produção de citocinas antagonistas, IL-10 e IL-12. IL-10 é uma citocina regulatória secretada tanto por macrófagos como células T e B, mastócitos e queratinócitos, atuando como limitadora da resposta inflamatória. Quando produzida por macrófagos, IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IL-6, além de interferir na apresentação de antígenos por macrófagos e monócitos através da diminuição da expressão da molécula de histocompatibilidade II (MHCII).

IL-12 é a principal mediadora da resposta imune inata inicial aos microrganismos intracelulares. Suas principais fontes são os fagócitos e as células dendríticas e é formada por duas subunidades, p-35 e p-40, sendo esta última produzidas apenas por APCs, consequentemente, somente estas células produzem a citocina ativa (ABBAS et al., 2003).

Quando ativados com LPS/ IFN-γ , macrófagos Raw 264.7, produziram NO e IL-10. Esta produção foi ainda maior quando foram adicionadas as subunidades e as menores doses de CDT (Figura 10). Estes resultados estão de acordo com a literatura, que mostra um predomínio de resposta de IL-10 em macrófagos Raw 264.7 ativados por LPS/ IFN-γ (RAHIM et al., 2005). Por outro lado, a produção de IL-12 foi induzida pela adição da holotoxina na dose mais alta, com diminuição da produção de NO. Um perfil semelhante foi observado quando os macrófagos receberam somente a CDT, sem a adição LPS/ IFN-γ, com exceção da inibição de IL-10 na dose mais alta da toxina(Figura 11).

As células peritoneais dos camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ não primadas ativadas com ConA/ IFN-γ apresentaram aumento da produção de IL-10 após a adição das subunidades CDT e as primeiras também com adição da menor dose de CDT. A adição de CDT nestas células não resultou em alterações significantes nos níveis de IL-10 ou IL-12, em relação ao controle (Figura 17).

Em contraste, nos ensaios empregando células peritoneais primadas de camundongos com a adição de IFN-γ durante o experimento, a produção de IL-12 aumentou com a adição de doses crescentes de CDT em ambas as linhagens (Figuras 18 e 19), sendo esta diferença mais evidente em células da linhagem C3H/HeJ. Estes dados estão de acordo com outros estudos que mostraram que células de camundongos C3H/HeJ estimulados previamente com um antígeno, tem seu perfil de resposta direcionado para Th1, produzindo altos níveis de IL-12 levando ao aparecimento de doenças respiratórias, como a asma, nesses camundongos (KEANE-MYERS et al., 1998).

A relação entre a presença de NO e a produção de citocinas IL-10 e IL-12 ainda não está totalmente esclarecida. A produção de fatores inflamatórios está correlacionada com a polarização dos macrófagos para M1, pela ativação clássica por fatores como LPS e IFN-γ. Esta ativação leva à secreção de IL-12 e à produção de NO como demonstrados nos controles das figuras 14/15 e 18/ 19. Entretanto, o presente estudo demonstrou que CDT levou a inibição na produção de NO e aumento de IL-12. Outros estudos também demonstraram que CDT induz a produção de citocinas proinflamatórias por monócitos humanos (AKIFUSA et al., 2001).

Portanto, a polarização macrofágica na presença da CDT necessita de mais esclarecimentos, já que não se inclui no perfil da ativação clássica ou alternativa.

O modo de ação da CDT sobre macrófagos propõe um outro modelo, com indução da produção de citocinas proinflamtórias como IL-12, e inibição da produção de NO, favorecendo a persistência da infecção associada a destruição dos tecidos promovida pelo quadro inflamatório e por maior atividade osteoclástica induzida pela menor produção de NO.

Em indivíduos PAgL, os níveis subgengivais de *A. actinomycetemcomitans* são mais elevados do que em outras formas de periodontite associadas a bactéria (FAVERI et al., *in press*). Consequentemente, a quantidade de CDT produzida poderia ser maior, levando a uma resposta imune inflamatória pela presença da IL-12 e à destruição tecidual, porém como a produção de NO é inibida, a eliminação do microrganismo seria pouco efetiva permitindo a colonização dos sítios subgengivais por altos níveis da bactéria, mas levando à perpetuação da periodontite.

Associados à modulação na resposta inflamatória promovida pela CDT de *A. actinomycetemcomitans* nos casos de periodontite agressiva, outros fatores do hospedeiro poderiam atuar ainda mais favorecendo a perpetuação da infecção. Ainda não está totalmente esclarecida a modulação da resposta imune pelo hospedeiro contra as doenças periodontais. Porém, vários estudos indicam que haveria a predominância de células Th1, com a detecção de IFN-γ, IL-1β e IL-2 em casos de periodontite agressiva, enquanto a resposta regulatória com a produção de citocinas como IL-4, estaria presente na infecção crônica causada pela *P. gingivalis* (HOURI-HADDAD et al., 2007).

Células dendríticas são capazes de produzir IL-12 e IFN-γ quando estimuladas com *A. actinomycetemcomitans* ou seu LPS, sugerindo que poderia haver interação entre células dendríticas derivadas de monócitos e a produção de IFN-γ estimulando a produção de IgG de subclasse 2 por linfócitos (KIKUCHI et al., 2004). A real proteção dos anticorpos contra *A actinomycetemcomitans* na periodontite ainda não foi esclarecida. Além disso, pouco se sabe sobre a presença de anticorpos contra a CDT.

Dadas as evidências de que CDT poderia estar envolvida na patogenia da doença periodontal, propiciadas pelo presente estudo e também por estudos anteriores (SMITH e BAYLES, 2006), consideramos definir os títulos de anticorpos contra a toxina em pacientes infectados por *A. actinomycetemcomitans*. O soro de pacientes com PAgL geralmente contem altos

títulos de anticorpos contra os antígenos de *A. actinomycetemcomitans*, incluindo a leutocotoxina RTX, proteínas da memebrana externa (OMPs) e os determinantes soroespecíficos do LPS (HENDERSON et al., 2002).

Assim, a infecção prévia pela bactéria foi determinada através da avaliação dos títulos de IgG contra os sorotipos mais prevalentes no soro de indivíduos com diferentes condições periodontais, além da determinação dos níveis de colonização pela bactéria no subgrupo de pacientes com PAgG. Para o ELISA foram empregados como antígenos células de amostras padrão de *A. actinomycetemcomitans* sorotipos a, b e c. Estudos prévios têm demonstrado que a utilização de cepas de *A. actinomycetemcomitans* padrões é tão eficiente quanto o uso de bactéria autóloga como antígenos para a detecção de IgG em soros dos pacientes por método de ELISA (VILKUNA-RAUTIAINEN et al., 2002).

Como esperado, a reatividade para os sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* foi observada em soros de indivíduos com periodontite agressiva. A maioria dos indivíduos PAgG também exibiu reatividade para a bactéria, o que está de acordo com a detecção de *A. actinomycetemcomitans* nas amostras subgengivais deste pacientes (Tabela 2 e 4). A associação de *A. actinomycetemcomitans* com a periodontite agressiva e sua baixa prevalência na periodontite crônica confirmou estudos prévios (FIVES-TAYLOR et al., 1999).

A maioria dos soros dos indivíduos PAgL foi reativa para o *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b, como indicado em outros estudos (TINOCO et al., 1997), enquanto os soros dos pacientes com PAgG responderam em proporção similar para os sorotipos b e c (Tabela 2). A associação dos sorotipos b e c com a forma agressiva da doença havia sido demonstrada em outras populações. Estudo prévio, realizado em nosso laboratório (KAWAMOTO, 2005), indicou a associação entre os sorotipos **b** e **c** com a forma agressiva da doença na população brasileira, enquanto o sorotipo **a** foi associado a indivíduos saudáveis. Diferenças na imunogenicidade dos sorotipos distintos de *A. actinomycetemcomitans* e/ou sua capacidade de atingir altas contagens no microambiente subgengival e induzir uma resposta humoral robusta poderiam levar a diferente prevalências de indivíduos soro reativos contra determinados sorotipos e entre os indivíduos PAgL e PAgG.

A reatividade sérica para os sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* correlacionou-se com a colonização subgengival por esta bactéria em indivíduos PAgG. *A. actinomycetemcomitans* foi detectado por sonda de DNA na maioria dos pacientes PAgG, apesar de dados indicando que a associação entre *A. actinomycetemcomitans* e a PAgG é menos clara do que a observada com a forma localizada (GMUR e BAEHNI, 1997). Em estudo recente em nosso laboratório, foi demonstrada, por análise clonal 16S rRNA, que a microbiota dos mesmos pacientes com PAgG era formada por muitas espécies não cultiváveis, particularmente formadas por espécies do gênero *Selenomonas* (FAVERI et al., 2008). Além disso, análise por sondas de DNA permitiu revelar que embora os nívies de *A. actinomycetemcomitans* nos pacientes com PAgG tenham sido maiores que os observados em indivíduos com periodonto saudável, as espécies do complexo vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*) foram os patógenos periodontais mais numerosos e prevalentes nestes indivíduos com PAgG (FAVERI et al., in press).

Os dados indicam claramente que apesar da reatividade dos soros contra *A. actinomycetemcomitans* em indivíduos PAgG, a resposta imune parece não ser capaz de eliminar o microrganismo. A ação protetora dos anticorpos na periodontite agressiva ainda é controversa. Soros de pacientes com PAgL possuem anticorpos IgG capazes de promover fagocitose e morte bacteriana por neutrófilos (BAKER et al., 1989). Além disso, a atividade concentração dependente de opsonização da *A. actinomycetemcomitans* na presença do complemento e a neutralização da atividade da leucotoxina foram demonstrados em soros de indivíduos PAgL (WILSON e HAMILTON, 1995, TSAI et al., 1981). Por outro lado, dados sugerem que a susceptibilidade à infecção por *A. actinomycetemcomitans* pode ser devido à produção de IgG2, a qual é menos eficiente na ligação aos receptores dos neutrófilos do que IgG1, levando à persistência da doença (WILSON e HAMILTON, 1995). Além disso, a habilidade de invadir células epiteliais e de produzir altos níveis de leucotoxina pode contribuir para a evasão do *A. actinomycetemcomitans* da defesa do hospedeiro (MEYER et al., 1997; FIVES-TAYLOR et al., 1999). Outros mecanismos como a produção de CDT poderiam interferir na geração de resposta imune protetora pelo hospedeiro. Estudos realizados em animais revelaram que a CDT é envolvida na elevada resposta inflamatória do tipo Th1 (FOX et al.,

2004). Além disso, cepas deficientes na produção de CDT não foram capazes de levar a uma elevada produção da resposta humoral aos antígenos bacterianos, em contraste com a cepa selvagem, indicando a ação da CDT na modulação da resposta do hospedeiro contra a bactéria (SMITH e BAYLES, 2006).

No presente estudo, não foram observadas diferenças na reatividade dos soros para a CDTA e CDTB entre os grupos estudados. Baixos níveis de IgG para a CDTB, porém positivos, foram mais prevalente em indivíduos PC quando comparados com os indivíduos saudáveis. Isso poderia ser explicada pela observação de que CDTB é a subunidade mais conservada entres as bactérias produtoras de CDT (HENDERSON et al., 2002). Como grupo PC é constituído por indivíduos com idade mais alta entre os grupos estudados, o aumento da resposta para a CDTB poderia ser o resultado de uma exposição a outras bactérias produtoras durante a vida, e não resultado de infecção por *A. actinomycetemcomitans*.

Apesar do fato da maioria dos indivíduos PAgL serem considerados reativos para a *A. actinomycetemcomitans*, não houve uma resposta significante para as subunidades CDT no soro destes indivíduos, indicando que estas proteínas não são fortes imunógenos neste grupo. Por outro lado, todos os indivíduos PAgG responderam com altos títulos de IgG para CDTC, havendo correlação entre a reatividade do soro para esta subunidade e para *A. actinomycetemcomitans* sorotipos **a** e **c**. Estes dados são controversos, uma vez que a reatividade do soro foi demonstrada em indivíduos com a forma mais disseminada da periodontite e nenhuma correlação foi verificada com a resposta a *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b. Apesar das diferenças nas respostas séricas para a CDTC entre a PAgL e PAgG, não houveram diferenças nos títulos de IgG para os sorotipos **b** e **c** de *A. actinomycetemcomitans* entre os grupos.

CDTs são provavelmente pobres imunógenos, como demonstrados em pacientes com cancro na fase aguda da doença e em modelos animais. Contatos repetidos com a bactéria ou altas doses da bactéria são necessários para obter resposta de anticorpos detectável em animais infectados experimentalmente, porém estes resultaram em atividade neutralizadora da atividade tóxica (PURVEN et al., 1997, LAGERGARD et al., 1997). Anticorpos neutralizadores desta citotoxina foram detectados em 66% dos pacientes com cancro, enquanto apenas 4% dos pacientes saudáveis controle apresentavam anticorpos

neutralizadores detectáveis (LAGERGARD et al., 1997). Outros estudos demonstraram que 32% de pacientes com cancro possuíam altos títulos de anticorpos anti HdCDT, comparados com 4% dos controle, o que indica que a infecção pode estimular a produção de anticorpos anti-HdCDT em alguns casos, mas não em todos os indivíduos infectados por *H. ducreyi* (MBWANA et al., 2003). Um estudo recente em pacientes com PAgL revelou que anticorpos para a CDT foram detectados em apenas 3 dos 23 pacientes (12,5%) (XYNOLAGA et al., 2009). Estes dados estão de acordo com a observação do presente estudo, em que os títulos de IgG para as subunidades CDT não se correlacionaram com os níveis subgengivais da bactéria determinados em pacientes PAgG (Tabela 4), possivelmente porque outros fatores estão interferindo nos níveis da bactéria nos sítios subgengivais. A diferença na resposta contra antígenos bacterianos entre pacientes PAgL e PAgG foi demonstrada previamente. Diferindo dos pacientes PAgG que apresentam resposta contra CDTC, todos os pacientes com PAgL apresentam resposta contra a proteína de membrana externa OMP29 (BRUNHEIRA, 2007).

A ausência de resposta de anticorpos anti-CDT em alguns indivíduos infectados com *A. actinomycetemcomitans* demonstrada pela resposta contra os sorotipos da bactéria e contra as OMP100 e OMP29, pode ser devido a diferenças na produção de CDT por organismos infectantes. *A. actinomycetemcomitans* positivos para os genes *cdtabc* foram encontrados em aproximadamente um terço dos pacientes com periodontite agressiva na população chinesa (TAN et al., 2002). Outros estudos mostram que a maioria dos isolados de *A. actinomycetemcomitans* apresentaram atividade CDT, embora variação da atividade e produção tenha sido demonstrada (FABRIS et al., 2002, YAMANO et al., 2003). Além disso, uma maior atividade citotóxica foi verificada em isolados dos sorotipos **b** e **c** do que do sorotipo **a** (KAWAMOTO, 2005).

A alta reatividade para a CDTC em indivíduos PAgG em relação aos PAgL poderia sugerir que a produção de anticorpos para esta subunidade requer a colonização por *A. actinomycetemcomitans* em múltiplos sítios por um período prolongado. Esta hipótese é reforçada pela análise do número de dentes afetados pela periodontite e a idade de ambos os grupos. Indivíduos PAgG exibiram no mínimo 12 dentes afetados pela doença, incluindo 6 molares e/ou incisivos e 6

dentes adicionais, enquanto em indivíduos PAgL, a periodontite era restrita a molares ou/e incisivos. Além disso, os membros do grupo PAgG (média 25 anos) eram mais velhos que os do grupo PAgL (média 19 anos). O presente dado associado a observações demonstrando que os níveis de colonização subgengival por *A. actinomycetemcomitans* em indivíduos PAgG são menores que aqueles atingidos pelos indivíduos PAgL (FAVERI et al., in press), sugerem que anticorpos para a CDTC poderiam ser protetores, permitindo o controle do número desta espécie nos sítios periodontais.

Baseados nas evidências que indicam a associação da CDT com a persistência da infecção em modelos animais, e com o aumento da expressão de RANKL e conseqüente osteoclastogênese, anticorpos neutralizadores contra a CDT poderia provavelmente afetar a progressão da periodontite (BELIBASAKIS et al., 2008). Nossos resultados demonstraram que soros de indivíduos PAgG apresentando anticorpos contra as subunidades CDTs foram capazes de inibir a atividade da toxina sobre as células CHO mais efetivamente que os soros de indivíduos peridontalmente saudáveis (entre 72,8~100% contra 61,2%, respectivamente), sugerindo uma ação protetora destes anticorpos.

Pacientes com cancro apresentaram anticorpos neutralizadores contra a HdCDT em apenas 22% dos casos e este efeito não se correlacionou com os títulos de anticorpos contra as subunidades CDT (MBWANA et al., 2003). Em pacientes PAgL 3 de 23 pacientes tinham anticorpos anti CDT e estes tinham propriedades neutralizadoras da atividade CDT (XYNOGALA et al., 2009). Também no presente estudo, todos os soros dos indivíduos PAgG apresentavam anticorpos anti CDTC e foram capazes de neutralizar a atividade CDT em maior nível que o soro de paciente controle.

Embora as implicações entre CDT e a patogênese ainda necessite de outros estudos, nossos dados demonstraram que CDT poderia interferir na atividade microbicida de macrófagos pela inibição da produção de NO, sendo possivelmente também envolvida com a doença periodontal pela indução de citocinas próinflamatórias. A ausência de resposta de IgG contra CDT em pacientes PAgL infectados por *A. actinomycetemcomitans* e a resposta de IgG contra CDT em pacientes PAgG deve ser melhor investigada, sugerindo a participação da CDT na diferenciação das formas da periodontite agressiva.

6 CONCLUSÃO

Baseados na metodologia empregada, podemos concluir que:

- CDT é capaz de inibir a proliferação de células epiteliais gengivais OBA-9, sugerindo que sua participação na destruição do epitélio interno da bolsa periodontal.

- CDT inibe a produção de NO e induz a produção de IL-12 por macrófagos Raw264.7 e peritoneais de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ, sugerindo que a atividade tóxica sobre macrófagos resultaria em maior destruição tecidual associada a diminuição da sua capacidade microbicida.

- CDTA e CDTB parecem ser pouco imunogênicas, não havendo associação entre resposta a estas subunidades e a infecção por *A. actinomycetemcomitans*. A subunidade CDTC induz resposta de IgG em pacientes infectados pela bactéria apresentando PAgG, mas não em pacientes com PAgL. Estes dados sugerem que CDT pode ser expressa diferentemente pelas cepas de *A. actinomycetemcomitans* de periodontite agressiva localizada e generalizada. Alternativamente, a resposta de anticorpos para este antígeno poderia requerer a colonização de múltiplos sítios por *A. actinomycetemcomitans*.

REFERÊNCIAS*

ABBAS, A.B.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S.**Imunologia Molecular e celular**. Tradução de Raimundo Martagão Gesteira. 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. Cap.11, p.235-269: Citocinas

ADAMS, D.O. Molecular interation in macrophage activation. **Immunol. Today**, v.10, p.33-35, 1989.

AHMED, H.J.; SVENSSON, L.A.; COPE, L.D.; LATIMER, J.L.; HANSEN, E.J.; AHLMAN, K.; et al. Prevalence of cdtABC genes encoding cytolethal distending toxin among *Haemophilus ducreyi* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains. **J. Med. Microbiol.**, v.50, p.860-864, 2001.

AKIFUSA, S.; POOLE, S.; LEWTHWAITE, J.; HENDERSON, B.; NAIR, S.P. Recombinant Actinobacillus actinomycetemcomitans cytolethal distending toxin proteins are required to interact to inhibit human cell cycle progression and to stimulate human leukocyte cytokine synthesis. **Infect. Immun.**, v. 69, p.5925-5930, 2001.

ALBANDAR, J.M.; DENARDIN, A.M.; ADESANYA, M.R.; DIEHL, S.R.; WINN, D.M. Associations between serum antibody levels to periodontal pathogens and early-onset periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 72, p.1463-1469, 2001.

ARMITAGE, C.G. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Ann. Periodontol**., v.4, p.1-6, 1999.

ASAKAWA, R.; KOMATSUZAWA, H.; KAWAI, T.; YAMADA, S.; GONCALVES, R.B.; IZUMI, S.; FUJIWARA, T.; NAKANO, Y.; SUZUKI, N.; UCHIDA, Y.; OUHARA, K.; SHIBA, H.; TAUBMAN, M.A.; KURIHARA, H.; SUGAI, M. Outer membrane protein 100, a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Mol. Microbiol.**, v.50, p.1125-1139, 2003.

ASAKURA, M.; SAMOSORNSUK, W.; TAGUCHI, M.; KOBAYASHI, K.; MISAWA, N.; KUSUMOTO, M.; NISHIMURA, K.; MATSUHISA, A.; YAMASAKI, S. Comparative analysis of cytolethal distending toxin (cdt) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. **Microb. Pathog.**, v.42, p.174-183, 2007.

ASIKAINEN, S.; LAI, C.H.; ALALUUSUA, S.; SLOTS, J.; Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.6, p.115-118, 1991.

BAEHNI, P.C.; TSAI, C.C.; MCARTHUR, W.P.; HAMMOND, B.F.; SHENKER, B.J.; TAICHMAN, N.S. Leukotoxic activity in different strains of the bacterium

---

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação; referências : elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

Actinobacillus actinomycetemcomitans isolated from juvenile periodontitis in man. **Arch. Oral Biol**., v.26, p.671-676, 1981.

BAKER, P.J.; WILSON, M.E. Opsonic IgG antibody against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.4, p.98-105, 1989.

BECK, J.D.; PANKOW, J.; TYROLER, H.A.; OFFENBACHER, S. Dental infections and atherosclerosis. **Am. Heart J.**, v.138, p.528-533, 1999.

BELIBASAKIS, G.; JOHANSSON, A.; WANG, Y.; CLAESSON, R.; CHEN, C.; ASIKAINEN, S.; KALFAS, S. Inhibited proliferation of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: involvement of the cytolethal distending toxin. **Eur. J. Oral Sci.**, v.110, p.366-373, 2002.

BELIBASAKIS, G.N.; BRAGE, M.; LAGERGARD, T.; JOHANSSON, A. Cytolethal distending toxin upregulates RANKL expression in Jurkat T-cells. **APMIS**, v.116, p.499-506, 2008.

BELIBASAKIS, G.N.; JOHANSSON, A.; WANG, Y.; CHEN, C.; KALFAS, S.; LERNER, U.H. The cytolethal distending toxin induces receptor activator of NF-kappaB ligand expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. **Infect. Immun.**, v.73, p.342-51, 2005a.

BELIBASAKIS, G.N.; JOHANSSON, A.; WANG, Y.; CHEN, C.; LAGERGARD, T.; KALFAS, S.; LERNER, U.H. Cytokine responses of human gingival fibroblasts to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin. **Cytokine**, v.30, p.56-63, 2005b.

BELIBASAKIS, G.N.; MATTSSON, A.; WANG, Y.; CHEN, C.; JOHANSSON, A. Cell cycle arrest of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: involvement of the cytolethal distending toxin. **APMIS**, v.112, p.674-685, 2004.

BOEHM, U.; KLAMP, T.; GROOT, M.; HOWARD, J.C. Cellular responses to interferon-gamma. **Annu. Rev. Immunol.**, v.15, p.749-795, 1997.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v.12, p.64-76, 2000.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-254, 1976.

BRUNHEIRA, A.T.P. **Detecção de *Aggregatibacter (Atinobacillus) actinomycetemcomitans* no biofilme subgengival e títulos séricos IgG contra OMP100 e OMP29.** São Paulo, 2007. 80f. Tese (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BUENO, L.C., MAYER, M.P., DIRIENZO, J.M. Relationship between conversion of localized juvenile periodontitis-susceptible children from health to disease and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin promoter structure. **J. Periodontol.**, v.69, p.998-1007, 1998.

CARLIN, J.M.; BORDEN, .E.C; BYRNE, G.I. Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity inhibits Chlamydia *psittaci* replication in human macrophages. **J Interferon. Res.**, v. 9, p.329-337, 1989.

CHIEN, C.C.; TAYLOR, N. S.; GE, Z., SCHAUER, D. B.; YOUNG, V. B.; FOX, J. G. Identification of cdt B homologues and cytolethal distending toxin activity in enterohepatic *Helicobacter spp*. **J. Med. Microbiol.**, v.49, p.525-534, 2000.

COMAYRAS, C.; TASCA, C.; PERES, S.Y.; DUCOMMUN, B.; OSWALD, E.; DE RYCKE, J. *Escherichia coli* cytolethal distending toxin blocks the HeLa cell cycle at the G2/M transition by preventing cdc2 protein kinase dephosphorylation and activation. **Infect. Immun.**, v.65, p.5088-5095, 1997.

DENG, K.; HANSEN, E.J. A CdtA-CdtC complex can block killing of Hela cells by *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin. **Infect. Immun.**, v.71, p.6633-6640, 2003.

DENG, K.; LATIMER, J.L.; LEWIS, D.A.; HANSEN, E.J. Investigation of the interaction among the components of the cytolethal distending toxin of *Haemophilus ducreyi*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.285, p.609-615, 2001.

DESHPANDE, S.S. **Enzyme Immunoassays from concept to product development.** In: Assay Development, Evaluation, and Validation. New York: Chapman e Hall, 1996. Capítulo 9, p. 343- 349.

DIEHL, S.R.; WU, T.; BURMEISTER, J.A.; CALIFANO, J.V.; BROOKS, C.N.; TEW, J.G.; SCHENKEIN, H.A. Evidence of a substantial genetic basis for IgG2 levels in families with aggressive periodontitis. **J. Dent. Res.** v.82, p.708-712, 2003.

DIRIENZO, J.M.; SONG, M.; WAN, L.S.; ELLEN, R.P. Kinetics of KB and HEp-2 cell responses to an invasive, cytolethal distending toxin-producing strain of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.17, p.245-251, 2002.

DIWAN, A.D.; WANG, M.X.; JANG, D.; ZHU, W.; MURRELL, G.A. Nitric oxide modulates fracture healing. **J. Bone Miner. Res.**, v.15, p.342-351, 2000.

DONG, Z.; QI, X.; XIE, K.; FIDLER, I.J. Protein tyrosine kinase inhibitors decrease induction of nitric oxide synthase activity in lipopolysaccharide-responsive and lipopolysaccharide-nonresponsive murine macrophages. **J. Immunol.**, v.151, p.2717-2724, 1993.

EBERSOLE, J.L.; FREY, D.E.; TAUBMAN, M.A.; SMITH, D.J. An ELISA for measuring serum antibodies to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Periodont. Res.**, v.15, p.621-632, 1980.

ELWEEL, C. A.; DREYFUS, L. A. Dnase I homologus residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest. **Mol. Biol.**, v.37, p.952-963, 2000.

ENGSTROM, P.E.; GEORGE, M.; LARSSON, P.; LALLY, E.T.; TAICHMAN, N.S.; NORHAGEN, G. Oral and systemic immunoglobulin G-subclass antibodies to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.14, p.104-108, 1999.

ESCALAS, N.; DAVEZAC, N.; DE RYCKE, J.; BALDIN, V.; MAZARS, R.; DUCOMMUN, B. Study of the cytolethal distending toxin-induced cell cycle arrest in HeLa cells: involvement of the CDC25 phosphatase. **Exp. Cell. Res**., v.257, p.206-212, 2000.

EZEKOWITZ, R.A.; GORDON, S. Alterations of surface properties by macrophage activation: expression of receptors for Fc and mannose-terminal glycoproteins and differentiation antigens. **Contemp. Top Immunobiol.**, v.13, p.33-56, 1984.

FABRIS, A.S.; DIRIENZO, J.M.; WIKSTROM, M.; MAYER, M.P. Detection of cytolethal distending toxin activity and *cdt* genes in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates from geographically diverse populations. **Oral Microbiol. Immunol**., v.17, p.231-238, 2002.

FAVERI, M.; FIGUEIREDO, L.C.; DUARTE, P.M.; MESTNIK, M.J.; MAYER, M.P.A.; FERES, M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. **J. Clin. Periodontol.** In press.

FAVERI, M.; MAYER, M.P.A; FERES, M.; DE FIGUEIREDO, L.C.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B.J. Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. **Oral Microbiol. Immunol**., v.23, p.112-118, 2008.

FERNANDES, K.P.; MAYER, M.P.A.; ANDO, E.S.; ULBRICH, A.G.; AMARANTE-MENDES, J.G.; RUSSO, M. Inhibition of interferon-gamma-induced nitric oxide production in endotoxin-activated macrophages by cytolethal distending toxin. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.23, p.360-366, 2008.

FINE, D.H.; KAPLAN, J.B.; KACHLANY, S.C.; SCHREINER, H.C. How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: A model for infectious diseases. **Periodontol. 2000**, v.42, p.114-157, 2006.

FIVES-TAYLOR, P.M.; MEYER, D.H.; MINTZ, K.P.; BRISSETTE, C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Periodontol. 2000**, v.20, p.136-167, 1999.

FOX, J.G.; ROGERS, A.B.; WHARY, M.T.; GE, Z.; TAYLOR, N.S.; XU, S.; ET AL. Gastroenteritis in NF-kappaB-deficient mice is produced with wild-type *Campylobacter jejuni* but not with *C. jejuni* lacking cytolethal distending toxin despite persistent colonization with both strains. **Infect. Immun.**, v.72, p.1116-1125, 2004.

FRISK, A.; LEBENS, M.; JOHANSSON, C.; AHMED, H.; SVENSSON, L.; AHLMAN K.; LAGERGARD, T. The role of different protein components from the *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin in the generation of cell toxicity. **Microb. Pathog.**, v.30, p.313-324, 2001.

FUJIHARA, M.; MUROI, M.; TANAMOTO, K.; SUZUKI, T.; AZUMA, H.; IKEDA, H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. **Pharmacol. Ther.**, v.100, p.171-194, 2003.

FUKADA, S.Y.; SILVA, T.A.; SACONATO, I.F.; GARLET, G.P.; AVILA-CAMPOS, M.J.; SILVA, J.S.; CUNHA, F.Q. iNOS-derived nitric oxide modulates infection-stimulated bone loss. **J. Dent. Res.**, v.87, p.1155-1159, 2008.

GAMONAL, J.; BASCONES, A.; ACEVEDO, A.; BLANCO, E.; SILVA, A. Apoptosis in chronic adult periodontitis analyzed by in situ DNA breaks, electron microscopy, and immunohistochemistry. **J. Periodontol**., v.72, p.517-525, 2001.

GARLET G.P.; CARDOSO, C.R.; CAMPANELLI, A.P.; GARLET, T.P.; AVILA-CAMPOS, M.J.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. The essential role of IFN-gamma in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. **Microbes Infect.**, v.10, p.489-496, 2008.

GARLET, G.P.; MARTINS, W.JR; FERREIRA, B.R.; MILANEZI, C.M.; SILVA, J.S. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. **J. Periodont. Res.**, v.38, p.210-217, 2003.

GE, Z.; FENG, Y.; WHARY, M.T.; NAMBIAR, P.R.; XU, S.; NG, V.; TAYLOR, N.S.; FOX, J.G. Cytolethal distending toxin is essential for *Helicobacter hepaticus* colonization in outbred Swiss Webster mice. **Infect. Immun.**, v.73, p.3559-3567, 2005.

GELFANOVA, V.; HANSEN, E. J.; SPINOLA, S. M. Cytolethal distending toxin of *Haemophilus ducreyi* induces apoptotic death of Jurkat T cells. **Infect. Immun**., v.67, p.6394-6402,1999.

GMUR, R.; BAEHNI, P.C. Serum immunoglobulin G responses to various *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in a young ethnographically heterogeneous periodontitis patient group. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.12, p.1-10, 1997.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat. Rev. Immunol.** v.3, p.23-35, 2003.

GOTOH, T.; MORI, M. Arginase II Downregulates Nitric Oxide (NO) Production and Prevents NO-mediated Apoptosis in Murine Macrophage-derived Raw 264.7 Cells. **J. Cell. Biol.**, v.144, p.427-434, 1999.

GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in germfree and convencional rat. **Science**, v.212, p.56-68, 1981

GRUENHEID, S.; GROS, P. Genetic susceptibility to intracellular infections: Nramp1, macrophage function and divalent cations transport. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.3, p.43-48, 2000.

GYURKO, R.; SHOJI, H.; BATTAGLINO, R.A.; BOUSTANY, G.; GIBSON, F.C.; GENCO, C.A.; et al.. Inducible nitric oxide synthase mediates bonedevelopment and *P. gingivalis*-induced alveolar bone loss. **Bone**, v.36, p.472-479, 2005.

HAGHJOO, E.; GALÁN, J.E. *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.30, p.4614-4619, 2004.

HENDERSON, B.; WILSON, M.; SHARP, L.; WARD, J.M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Med. Microbiol.**, v.51, p.1013-1020, 2002.

HICKEY, T.E.; MAJAM, G.; GUERRY, P. Intracellular survival of *Campylobacter jejuni* in human monocytic cells and induction of apoptotic death by cytholethal distending toxin. **Infect. Immun.**, v.73, p.5194-5197, 2005.

HONDA, T.; DOMON, H.; OKUI, T.; KAJITA, K.; AMANUMA, R.; YAMAZAKI, K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. **Clin. Exp. Immunol.**, v.144, p.35-40, 2006.

HOURI-HADDAD, Y.; WILENSKY, A.; SHAPIRA, L. T-cell phenotype as a risk factor for periodontal disease. **Periodontol. 2000**, v.45, p.67-75, 2007.

ISHIHARA, Y.; NISHIHARA, T.; MAKI, E.; NOGUCHI, T.; KOGA, T. Role of interleukin-1 and prostaglandin in in vitro bone resorption induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. **J. Periodont. Res.**, v.26, p.155-160, 1991.

JOHNSON W.M.; LIOR H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material. **Microb. Pathog.**, v.4, p.103-113, 1988a.

JOHNSON, W. M.; LIOR, H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CDTL) produced by *Campylobacter ssp*. **Mícrob. Pathog.**, v.4, p.115-126,1988b.

JOHNSON, W. M.; LIOR, H. response of Chinese hamster ovary cell to a cytolethal distending toxin (CDT) of *Escherichia coli* and possible misimterpretation as heat-labile (LT) enterotoxin. **FEMS Microbiol. Lett**., v.43, p.19-23, 1987b.

JORENS, P.G.; VAN OVERVELD, F.J.; VERMEIRE, P.A.; BULT, H.; HERMAN, A.G. Synergism between interleukin-1β and interferon–γ, an inducer of nitric oxide synthase, in rat lung fibroblasts. **Eur. J. Pharmacol**., v.224, p.7-12, 1992.

KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1589, p.1-13, 2002.

KAPLAN, J.B.; SCHREINER, H.C.; FURGANG, D.; FINE, D.H. Population structure and genetic diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains isolated from localized juvenile periodontitis patients. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p.1181-1187, 2002.

KAWAMOTO, D. **Atividade tóxica distensora citoletal e genotipagem por PCR da região cdt e da região promotora do operon *ltx* de isolados clínicos de *A. actinomycetemcomitans*.** 2005. Tese (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

KEANE-MYERS, A.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; WILLS-KARP, M. Resistance to antigen-induced airway hyperresponsiveness requires endogenous production of IL-12. **J. Immunol.**, v.161, p.919-926, 1998.

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

KIKKERT, R.; LAINE, M.L.; AARDEN, L.A.; VAN WINKELHOFF, A.J. Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.22, p.145-151, 2007.

KIKUCHI, T.; HAHN, C.L.; TANAKA, S.; BARBOUR, S.E.; SCHENKEIN, H.A.; TEW, J.G. Dendritic cells stimulated with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* elicit rapid gamma interferon responses by natural killer cells. **Infect. Immun.**, v.72, p.5089-5096, 2004.

KINANE, D.F.; MOONEY, J.; EBERSOLE, J.L. Humoral immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. **Periodontol. 2000**, v.2, p.289-340, 1999.

KOROSTOFF, J.; YAMAGUCHI, N.; MILLER, M.; KIEBA, I.; LALLY, E,T. Perturbation of mitochondrial structure and function plays a central role in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin-induced apoptosis. **Microb. Pathog.**, v.29, p.267-278, 2000.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LAGERGARD, T.; PURVEN, M. Neutralizing antibodies to *Haemophilus ducreyi* cytotoxin. **Infect. Immun.**, v.61, p.1589-1592, 1997.

LALLY, E. T.; KIEBA, I. R.; ELLIS, E. G.; LEAR, J. D, TANAKA, J. C. Structure function aspects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leucotoxin. **J. Periodontol.**, v.67, p. 298-308, 1996.

LAPPIN, D.F.; KJELDSEN, M.; SANDER, L.; KINANE, D.F. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. **J. Periodont. Res.**, v.35, p.369-373, 2000.

LARA-TEJERO, M.; GALAN, J.E. A bacterial toxin that controls cell cycle progression as deoxyribonucleaseI-like protein. **Science**, v.290, p.354-357, 2000.

LAUBE, D.M.; DONGARI-BAGTZOGLOU, A.; KASHLEVA, H.; ESKDALE, J.; GALLAGHER, G.; DIAMOND, G. Differential regulation of innate immune response genes in gingival epithelial cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **J. Periodont. Res.**, v.43, p.116-123, 2008.

LEE, R.B.; HASSANE, D.C.; COTTLE, D.L.; PICKETT, C.L. Interactions of *Camphylobacter jejuni* cytolethal distending toxin subunits CdtA and CdtC with HeLa cells. **Infect. Immun.**, v.71, p.4883-4890, 2003.

LEWIS, D.A.; STEVENS, M.K.; LATIMER, J.L.; WARD, C.K.; DENG, K.; BLICK, R.; et al. Characterization of *Haemophilus ducreyi* cdtA, cdtB, and cdtC mutants in in vitro and in vivo systems. **Infect. Immun.**, v.69, p.5626-5634, 2001.

LI, L.; SHARIPO, A.; CHAVES-OLARTE, E.; MASUCCI, M.G.; LEVITSKY, V.; THELESTAM, M.; FRISAN, T. The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin activates sensors of DNA damage and repair complexes in proliferating and non-proliferating cells. **Cell. Microbiol.**, v.4, p.87-99, 2002.

LÓPEZ, N.J.; SMITH, P.C.; GUTIERREZ, J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. **J. Periodontol.**, v.73, p.911-924, 2002.

MACMICKING, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, v.15, p.323-350, 1997.

MAO, X.; DIRIENZO, J.M. Functional studies of the recombinant subunits of a cytolethal distending holotoxin. **Cell. Microbiol.**, v.4, p.245-255, 2002.

MARTINEZ, F.O.; SICA, A.; MANTOVANI, A.; LOCATI, M. Macrophage activation and polarization. **Front. Biosci.,** v.13, p.453-461, 2008.

MAYER, P. A. M.; BUENO, L. C.; HANSEN, E. J.; DiRIENZO, J. M. Identification of a Cytolethal Distending toxin Gene Locus and Features of a Virulence-associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, v. 67, p.1227-1237, 1999.

MBWANA, J.; AHMED, H.J.; AHLMAN, K.; SUNDAEUS, V.; DAHLEN, G.; LYAMUYA, E.; ET AL. Specificity of antibodies directed against the cytolethal distending toxin of *Haemophilus ducreyi* in patients with chancroid. **Microb. Pathog.**, v.35, p.133-137, 2003.

MCCARTNEY-FRANCIS, N.L.; SONG, X.; MIZEL, D.E.; WAHL, S.M. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates erosive joint disease. **J. Immunol.**, v.166, p.2734-2740, 2001.

MEALEY, B.L.; ROSE, L.F. Diabetes mellitus and inflammatory periodontal diseases. **Compend. Contin. Educ. Dent.**, v.29, p.402-408, 2008.

MEYER, D.H.; FIVES-TAYLOR, P.M. Characteristics of adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. **Infect. Immun.**, v.62, p.928-935, 1994.

MEYER, D.H.; MINTZ, K.P.; FIVES-TAYLOR, P.M. Models of invasion of enteric and periodontal pathogens into epithelial cells: a comparative analysis. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v.8, p.389-409, 1997.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOSSER, D.M.; HANDMAN, E. Treatment of murine macrophages with interferon-gamma inhibits their ability to bind leishmania promastigotes. **J. Leukoc. Biol.**, v.52, p.369-376, 1992.

NESIC, D.; HSU, Y.; STEBBINS C.E. Assembly and function of a bacterial genotoxin. **Nature**, v.429, p.429-433, 2004.

NISHIDA, E.; HARA, Y.; KANEKO, T.; IKEDA, Y.; UKAI, T.; KATO, I. Bone resorption and local interleukin-1alpha and interleukin-1beta synthesis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. **J. Periodont. Res.**, v.36, p.1-8, 2001.

NØRSKOV-LAURITSEN, N.; KILIAN, M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *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. 2135-46, 2006.

OLSEN, I.; SHAH, H.N.; GHARBIA, S.E. Taxonomy and biochemical characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. **Periodontol. 2000**, v.2, p.14-52, 1999.

PARKHILL, J.; DOUGAN, G.; JAMES, K.D.; THOMSON, N.R.; PICKARD, D.; WAIN, J.; CHURCHER, C.; ET AL. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar *Typhi* CT18. **Nature**, v.413, p.848-852, 2001.

PURDY, D.; BUSWELL, C.M.; HODGSON, A.E.; MCALPINE, K.; HENDERSON, I.; LEACH, S.A. Characterisation of cytolethal distending toxin (CDT) mutants of *Campylobacter jejuni*. **J. Med. Microbiol.**, v.49, p.473-479, 2000.

PURVEN, M.; FRISK, A.; LONNROTH, I.; LAGERGARD, T. Purification and identification of *Haemophilus ducreyi* cytotoxin by use of a neutralizing monoclonal antibody. **Infect. Immun.**, v.65, p.3496-3499, 1997.

RABIN, S.D.; FLITTON, J.G.; DEMUTH, D.R. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin induces apoptosis in non-proliferating macrophages by a phosphatase-independent mechanism. **Infect. Immun.** In press.

RAES, G.; BESCHIN, A.; GHASSABEH, G.H.; DE BAETSELIER, P. Alternatively activated macrophages in protozoan infections. **Curr. Opin. Immunol.**, v.19, p.454-459, 2007.

RAHIM, S.S.; KHAN, N.; BODDUPALLI, C.S.; HASNAIN, S.E.; MUKHOPADHYAY, S. Interleukin-10 (IL-10) mediated suppression of IL-12 production in Raw 264.7 cells also involves c-rel transcription factor. **Immunology**, v.114, p.313-321, 2005.

RESTAÍNO, C.G.; CHAPARRO, A.; VALENZUELA, M.A.; KETTLUN, A.M.; VERNAL, R.; SILVA, A.; PUENTE, J.; ET AL. Stimulatory response of neutrophils from periodontitis patients with periodontal pathogens. **Oral Dis.**, v.13, p.474-481, 2007.

RODRIGUES, M.R.; RODRIGUEZ, D.; HENRIQUE CATALANI, L.; RUSSO, M.; CAMPA, A. Interferon-gamma independent oxidation of melatonin by macrophages.**J. Pineal Res.**, v.34, p.69-74, 2003.

ROSEN, G.; NISIMOV, I.; HELCER, M.; SELA, M.N. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b lipopolysaccharide mediates coaggregation with *Fusobacterium nucleatum*. **Infect. Immun.**, v.71, p.3652-3656, 2003.

SCHENKEIN, H.A.; BARBOUR, S.E.; TEW, J.G. Cytokines and inflammatory factors regulating immunoglobulin production in aggressive periodontitis. **Periodontol. 2000.**, v.45, p.113-127, 2007.

SCOTT, D. A.; KAPER, B. J. Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. **Infect.Immun.**, v.62, p.244-251, 1994.

SHENKER, B. J.; MCKAY, T.; DATAR, S.; MILLER, M.; CHOWHAN, R.; DEMUTH, D.R. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* immunosuppressive protein is a member of the family of cytolethal distending toxins capable of causing a G2 arrest in human T cells. **J. Immunol.**, v.167, p.4773-4780, 1999.

SHENKER, B.J.; BESACK, D.; McKAY, T.; PANKOSKI, L.; ZEKAVAT, A.; DEMUTH, D.R. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin (CDT): evidence that holotoxin is composed of three subunits: CdtA, CdtB, and CdtC. **J. Immunol.**, v.172, p.410-417, 2004.

SHENKER, B.J.; BESACK, D.; McKAY, T.; PANKOSKI, L.; ZEKAVAT, A.; DEMUTH, D.R. Induction of cell cycle arrest in lymphocytes by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin requires three subunits for maximum activity. **J. Immunol.**, v.174, p.2228-2234, 2005.

SHENKER, B.J.; DEMUTH, D.R.; ZEKAVAT, A. Exposure of lymphocytes to high doses of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin induces rapid onset of apoptosis-mediated DNA fragmentation. **Infect. Immun.**, v.74, p.2080-2092, 2006.

SHENKER, B.J.; DLAKIC, M.; WALKER, L.P.; BESACK, D.; JAFFE, E.; LABELLE, E.; BOESZE-BATTAGLIA, K. A novel mode of action for a

microbial-derived immunotoxin: the cytolethal distending toxin subunit B exhibits phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate phosphatase activity. **J. Immunol.**, v.15, p.5099-5108, 2007.

SHENKER, B.J.; HOFFMASTER, R.H.; MCKAY, T.L.; DEMUTH, D.R. Expression of the cytolethal distending toxin (Cdt) operon in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: evidence that the CdtB protein is responsible for G2 arrest of the cell cycle in human T cells. **J. Immunol.**, v.165, p.2612-2618, 2000.

SHENKER, B.J.; HOFFMASTER, R.H.; ZEKAVAT, A.; YAMAGUCHI, N.; LALLY, E.T.; DEMUTH, D.R. Induction of apoptosis in human T cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin is a consequence of G2 arrest of the cell cycle. **J. Immunol.**, v.167, p.435-441, 2001.

SHERMAN, P.A.; LAUBACH, V.E.; REEP, B.R.; WOOD, E.R. Purification and cDNA sequence of na inducible nitric oxide synthase from a human tumor cell line. **Biochem.**, v.32, p.11600-11605, 1993.

SHIBATA, K.; WARBINGTON, M.L.; GORDON, B.J.; KURIHARA, H.; VAN DYKE TE. Nitric oxide synthase activity in neutrophils from patients with localized aggressive periodontitis. **J. Periodontol.**, v.72, p.1052-1058, 2001.

SLOTS, J.; LISTGARTEN, M.A. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, v.15, p.85-93, 1988.

SLOTS, J.; ZAMBON, J. J.; ROSLING, B. G.; REYNOLDS, H. S.; CHRISTERSSON, L. A.; GENCO, R. J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. **J.Perodont. Res.**,v.17, p.447-448, 1982.

SMITH, C.W.; GOLDMAN, A.S. Effects of concanavalin A and pokeweed mitogen in vivo on mouse peritoneal macrophages. **Exp. Cell. Res.**, v.73, p.394-398, 1972.

SMITH, J.L.; BAYLES, D.O. The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. **Crit. Rev. Microbiol.**, v.32, p.227-248, 2006.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. **J. Periodont. Res.**, v.26, p.195-212, 1991.

STUEHR, D.J.; MARLETTA, M.A. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon γ. **J. Immunol.**, v.139, p.518-525, 1987.

SUGAI, M.; KAWAMOTO, T.; PERES, S. Y.; UENO, Y.; et al.The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by Actinobacillus actinomycetemcomitans is a cytolethal distending toxin. **Infect. Immun.**, v.66, p.5008-5019, 1998.

SVENSSON, L.A.; TARKOWSKI, A.; THELESTAM, M.; LAGERGARD, T. The impact of *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin on cells involved in immune response. **Microb. Pathog.**, v.30, p.157-166, 2001.

TAKAHASHI, K.; OHYAMA, H.; KITANAKA, M.; SAWA, T.; MINESHIBA, J.; NISHIMURA, F.; ARAI, H.; ET AL. Heterogeneity of host immunological risk factors in patients with aggressive periodontitis. **J. Periodontol.**, v.72, p.425-437, 2001.

TAKAHASHI, N.; KOBAYASHI, M.; TAKAKI, T.; TAKANO, K.; MIYATA, M.; OKAMATSU, Y.; HASEGAWA, K.; ET AL. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide stimulates collagen phagocytosis by human gingival fibroblasts. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.23, p.259-264, 2008.

TAN, K.S.; SONG, K.P.; ONG, G. Cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Occurrence and association with periodontal disease. **J. Periodont. Res.**, v.37, p.268-272, 2002.

TEIXEIRA, R.E.; MENDES, E.N.; ROQUE DE CARVALHO, M.A.; NICOLI, J.R.; FARIAS, L.D.E.M.; MAGALHÃES, P.P. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype-specific genotypes and periodontal status in Brazilian subjects. **Can. J. Microbiol.**, v.52, p.182-188, 2006.

TENG, Y.T.; MAHAMED, D.; SINGH, B. Gamma interferon positively modulates *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-specific RANKL+ CD4+ Th-cell-mediated alveolar bone destruction in vivo. **Infect. Immun.**, v.73, p. 3453-3461, 2005.

TINOCO, E.M.; LYNGSTADAAS, S.P.; PREUS, H.R.; GJERMO, P. Attachment loss and serum antibody levels against autologous and reference strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in untreated localized juvenile periodontitis patients. **J. Clin. Periodontol.**, v.24, p.937-944, 1997.

TSAI, C.C.; MCARTHUR, W.P.; BAEHNI, P.C.; EVIAN, C.; GENCO, R.J.; TAICHMAN, N.S. Serum neutralizing activity against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin in juvenile periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v.8, p.338-348, 1981.

UCHIDA, Y.; SHIBA, H.; KOMATSUZAWA, H.; TAKEMOTO, T.; SAKATA, M.; FUJITA, T.; KAWAGUCHI, H.; ET AL. Expression of IL-1 beta and IL-8 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Cytokine**, v.14, p.152-161, 2001.

VEIHELMANN, A.; LANDES, J.; HOFBAUER, A.; DORGER, M.; REFIOR, H.J.; MESSMER, K.; et al. Exacerbation of antigen-induced arthritis in inducible nitric oxide synthase-deficient mice. **Arthritis Rheum.**, v.44, p.1420-1427,2001.

VILKUNA-RAUTIAINEN, T.; PUSSINEN, P.J.; MATTILA, K.; VESANEN, M.; AHMAN, H.; DOGAN, B.; ET AL. Antigenically diverse reference strains and autologous strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are equally efficient antigens in enzyme-linked immunosorbent assay analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p.4640-4645, 2002.

WANG, M.J.; JENG, K.C.G.; SHIH, P.C. Differential expression of inducible nitric oxide synthase gene by alveolar and peritoneal macrophages in lipopolysaccharide-hyporesponsive C3H/HeJ Mice. **Immunol.**, v.98, p.497-503, 1999.

WILSON, M.E. The heat-modifiable outer membrane protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: relationship to OmpA proteins. **Infect. Immun.**, v.59, p.2505-2507, 1991.

WILSON, M.E.; BRONSON, P.M.; HAMILTON, R.G. Immunoglobulin G2 antibodies promote neutrophil killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, v. 63, p.1070-1075, 1995.

WILSON, M.E.; HAMILTON, R.G. Immunoglobulin G subclass response of juvenile periodontitis subjects to principal outer membrane proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, v.63, p.1062-1069, 1995.

WISING, C.; AZEM, J.; ZETTERBERG, M.; SVENSSON, L.A.; AHLMAN, K.; LAGERGARD, T. Induction of apoptosis/necrosis in various human cell lineages by *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin. **Toxicon**, v.45, p.767-776, 2005.

XU, T.; LUNDQVIST, A.; AHMED, H.J.; ERIKSSON, K.; YANG, Y.; LAGERGARD, T. Interactions of *Haemophilus ducreyi* and purified cytolethal distending toxin with human monocyte-derived dendritic cells, macrophages and CD4+ T cells. **Microbes Infect**., v.6, p.1171-1181, 2004.

XYNOGALA, I.; VOLGINA, A.; DIRIENZO, J.M.; KOROSTOFF, J. Evaluation of the humoral immune response to the cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 in subjects with localized aggressive periodontitis. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.24, p.116-123, 2009.

YAMANO, R.; OHARA, M.; NISHIKUBO, S.; FUJIWARA, T.; KAWAMOTO, T.; UENO, Y.; ET AL. Prevalence of cytolethal distending toxin production in periodontopathogenic bacteria. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, p.1391-1398, 2003.

YANG, H.W.; HUANG, Y.F.; CHAN, Y.; CHOU, M.Y. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. **Eur. J. Oral Sci.**, v.113, p.28-33, 2005.

YOUNG, V. B.; KNOX, K. A.; SCHAUER, D.B. Citolethal distending toxin sequence and activity in the enterohepatic pathogen *Helicobacter hepaticus*. **Infect. Immun.**, v.68, p.184-191, 2000a.

YOUNG, V.B.; CHIEN, C. C.; KNOX, K.; TAYLOR, N. S.; SCHAURER, D. B.; FOX, J. G. Citolethal distending toxin in avian and human isolates of *Helicobacter pullorum*. **J. Infect. Dis.**, v.182, p.620-623, 2000b.

ZAMBON, J.J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v.12, p.1-20, 1985.

ZAMBON, J.J.; REYNOLDS, H.S.; GENCO, R.J. Studies of the subgingival microflora in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **J Periodontol.**, v.61, p.699-704, 1990.

ZAMBON, J.J.; SLOTS, J.; GENCO, R.J. Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. **Infect. Immun.**, v. 41, p.19-27, 1983.

ANEXOS

Anexo A- Soros de pacientes utilizados, diagnóstico da saúde periodontal, idade, gênero e raça.

Paciente	Diagnóstico	Idade	Gênero	Etnia
1020-06	PAgG	24	feminino	afro
1023-06	PAgG	25	masculino	afro
1024-06	PAgG	25	feminino	caucasiano
1025-06	PAgG	20	feminino	caucasiano
1026-06	PAgG	25	feminino	afro
1027-06	PAgG	30	feminino	afro
1028-06	PAgG	29	masculino	afro
1029-06	PAgG	18	feminino	afro
1030-06	PAgG	25	masculino	caucasiano
1021-06	PAgG	30	feminino	afro
1022-06	PAgG	24	feminino	caucasiano
10013-99	PAgL	17	feminino	caucasiano
10032-99	PAgL	24	masculino	afro
1009-98	PAgL	16	feminino	afro
002-A1	PAgL	24	feminino	afro
10028-99	PAgL	24	masculino	caucasiano
10021-99	PAgL	16	feminino	afro
10048-00	PAgL	18	feminino	afro
10029-99	PAgL	19	feminino	afro
10066-00	PAgL	N/D	feminino	caucasiano
10052-00	PAgL	23	feminino	caucasiano
0001-A1	PAgL	22	masculino	caucasiano
10011-98	PAgL	15	feminino	caucasiano
10018-99	PAgL	21	feminino	caucasiano
10019-99	PAgL	19	feminino	caucasiano
10060-00	PAgL	20	feminino	afro
10073-00	PAgL	28	feminino	caucasiano
011-A1	PAgL	13	feminino	caucasiano
10020-99	PAgL	22	feminino	afro
003-A1	PAgL	19	feminino	afro
008-A1	PAgL	18	feminino	afro
10024-99	PAgL	17	feminino	afro
10045-00	PAgL	21	feminino	afro
1002-05	PAgL	21	feminino	caucasiano
1005-05	PAgL	19	feminino	caucasiano
1001-05	Saud	31	feminino	caucasiano
1003-05	Saud	25	feminino	caucasiano
1008-05	Saud	20	feminino	caucasiano
1006-05	Saud	34	feminino	caucasiano
1007-05	Saud	24	feminino	caucasiano
10010-98	Saud	13	masculino	caucasiano
10043-00	Saud	17	feminino	caucasiano
10063-00	Saud	14	feminino	caucasiano
1004-05	Saud	38	masculino	caucasiano

10008-98	Saud	14	masculino	caucasiano
1009-05	Saud	27	feminino	caucasiano
1010-05	Saud	42	masculino	afro
1011-05	Saud	31	feminino	caucasiano
10084-00	Saud	20	feminino	afro
10065-00	Saud	19	masculino	afro
10054-00	Saud	31	feminino	caucasiano
10076-00	Saud	39	masculino	caucasiano
10091-00	Saud	47	feminino	caucasiano
10090-00	Saud	40	feminino	caucasiano
10041-00	Saud	17	masculino	caucasiano
10057-00	Saud	28	feminino	afro
10035-00	Saud	20	feminino	caucasiano
10037-00	Saud	22	feminino	caucasiano
10039-00	Saud	19	feminino	caucasiano
10034-00	Saud	19	feminino	afro
10003-98	Saud	23	feminino	caucasiano
10005-98	Saud	19	feminino	caucasiano
10044-00	Saud	17	feminino	caucasiano
1002-98	Saud	27	feminino	caucasiano
1004-98	Saud	23	feminino	afro
10058-00	Saud	17	feminino	afro
10023-99	PC	55	masculino	caucasiano
10025-99	PC	41	masculino	caucasiano
10053-00	PC	47	masculino	caucasiano
10055-00	PC	57	masculino	afro
10056-00	PC	45	feminino	caucasiano
10061-00	PC	38	feminino	caucasiano
10062-00	PC	43	feminino	caucasiano
10064-00	PC	51	masculino	caucasiano
10071-00	PC	40	feminino	caucasiano
10074-00	PC	37	feminino	caucasiano
10075-00	PC	33	feminino	caucasiano
10077-00	PC	42	feminino	caucasiano
10079-00	PC	49	masculino	caucasiano
10081-00	PC	52	masculino	caucasiano
10083-00	PC	39	masculino	caucasiano
10092-00	PC	53	feminino	caucasiano
10093-00	PC	57	masculino	caucasiano

Dados não disponíveis: estão representados por -. PAgL-Periodontite Agressiva Localizada, PAgG -Periodontite Agressiva Generalizada, PC-Periodontite Crônica e Saud-Saudáveis.

Anexo B- Níveis de IgG séricos reativos aos diferentes sorotipos de *A. actinomycetemcomitans*, obtidos da reação de ELISA com diluição do soro de 1:20,000.

		Valores de DO_{490nm} corrigidos (F_Aa)		
Soro	Diagnóstico	F_ATCC20	F_JP2-20	F_SA-20
1020-06	PAgG	-0,197	1,906	-0,259
1023-06	PAgG	-0,207	-0,120	0,614
1024-06	PAgG	-0,163	1,701	-0,117
1025-06	PAgG	-0,129	0,008	0,299
1026-06	PAgG	0,361	2,518	0,418
1027-06	PAgG	-0,086	0,085	-0,151
1028-06	PAgG	-0,238	-0,109	-0,159
1029-06	PAgG	-0,050	1,773	-0,230
1030-06	PAgG	-0,222	-0,166	-0,308
1021-06	PAgG	0,263	0,039	0,160
1022-06	PAgG	-0,143	-0,044	0,068
10013-99	PAgL	-0,198	0,592	-0,296
10032-99	PAgL	0,518	0,121	-0,163
1009-98	PAgL	-0,097	1,980	-0,110
002-A1	PAgL	-0,234	-0,026	-0,368
10028-99	PAgL	-0,231	0,014	0,062
10021-99	PAgL	-0,217	-0,132	-0,095
10048-00	PAgL	-0,042	2,748	-0,104
10029-99	PAgL	-0,217	0,439	-0,334
10066-00	PAgL	-0,157	-0,096	-0,347
10052-00	PAgL	-0,172	-0,168	0,167
0001-A1	PAgL	0,004	-0,098	-0,239
10011-98	PAgL	-0,217	-0,175	-0,068
10018-99	PAgL	-0,159	-0,098	-0,340
10019-99	PAgL	-0,090	2,013	-0,145
10060-00	PAgL	0,217	2,128	0,263
10073-00	PAgL	1,904	0,153	0,452
011-A1	PAgL	0,012	0,951	-0,133
10020-99	PAgL	0,206	0,582	-0,264
003-A1	PAgL	-0,074	-0,132	-0,321
008-A1	PAgL	-0,253	0,833	-0,243
10024-99	PAgL	-0,104	1,035	-0,049
10045-00	PAgL	-0,102	0,123	-0,255
1002-05	PAgL	-0,092	2,675	0,064
1005-05	PAgL	0,034	1,179	0,001
1001-05	Saud	-0,198	-0,005	-0,111
1003-05	Saud	-0,143	-0,072	-0,239
1008-05	Saud	-0,168	-0,120	-0,104
1006-05	Saud	-0,230	-0,149	-0,327
1007-05	Saud	-0,128	-0,127	-0,083
10010-98	Saud	-0,199	-0,074	-0,279
10043-00	Saud	-0,255	-0,149	-0,151
10063-00	Saud	-0,268	-0,135	-0,079
1004-05	Saud	-0,127	-0,048	-0,260
10008-98	Saud	-0,227	-0,071	-0,316
10084-00	Saud	0,082	-0,143	-0,306

10065-00	Saud	-0,165	0,432	-0,253
10054-00	Saud	-0,112	-0,066	-0,173
10076-00	Saud	-0,178	-0,150	-0,123
10091-00	Saud	0,029	-0,057	-0,110
10090-00	Saud	-0,086	-0,048	0,223
10041-00	Saud	-0,184	0,163	-0,335
10057-00	Saud	-0,058	-0,156	-0,332
10035-00	Saud	-0,202	-0,151	-0,292
10037-00	Saud	-0,146	-0,127	0,354
10039-00	Saud	-0,213	-0,148	-0,178
10034-00	Saud	-0,220	-0,091	0,001
10003-98	Saud	0,070	-0,133	-0,318
10005-98	Saud	-0,197	-0,124	-0,088
10044-00	Saud	-0,135	-0,178	-0,347
1002-98	Saud	-0,199	-0,174	-0,375
1004-98	Saud	-0,217	-0,171	-0,266
10058-00	Saud	-0,229	-0,153	-0,223
10023-99	PC	-0,182	-0,145	-0,282
10025-99	PC	-0,181	0,105	-0,239
10053-00	PC	-0,238	-0,153	-0,201
10055-00	PC	-0,104	-0,072	0,274
10056-00	PC	-0,273	-0,173	-0,345
10061-00	PC	-0,156	-0,124	-0,239
10062-00	PC	-0,187	0,624	-0,281
10064-00	PC	-0,119	-0,103	-0,149
10071-00	PC	-0,180	-0,148	-0,265
10074-00	PC	-0,238	-0,175	-0,182
10075-00	PC	-0,147	-0,125	-0,318
10077-00	PC	-0,199	-0,144	-0,293
10079-00	PC	-0,116	-0,137	0,197
10081-00	PC	-0,201	-0,084	-0,328
10083-00	PC	-0,181	-0,110	-0,230
10092-00	PC	-0,245	-0,182	-0,359
10093-00	PC	-0,217	-0,116	-0,312

PAgL-Periodontite Agressiva Localizada, PAgG-Periodontite Agressiva Generalizada, PC-Periodontite Crônica e Saud-Saudáveis.

Anexo C- Níveis de IgG séricos reativos às subunidades CDTA, CDTB e CDTC, obtidos da reação de ELISA com diluição do soro de 1:150 de pacientes com diferentes condições peridodontais.

		Valores de DO_{490nm} corrigidos (F_CDT)		
Paciente	Diagnóstico	FCDTA 1:150	FCDTB 1:150	FCDTC 1:150
1020-06	PAgG	0.045	0.038	0.240
1023-06	PAgG	-0.361	0.064	0.521
1024-06	PAgG	0.185	0.397	0.427
1025-06	PAgG	0.557	0.300	0.436
1026-06	PAgG	-0.053	-0.037	0.522
1027-06	PAgG	1.594	0.512	0.435
1028-06	PAgG	-0.260	-0.028	0.260
1029-06	PAgG	-0.097	-0.119	0.272
1030-06	PAgG	-0.369	-0.082	0.266
1021-06	PAgG	0.062	-0.026	0.696
1022-06	PAgG	-0.314	-0.638	0.278
10013-99	PAgL	-0.681	-0.880	-0.436
10032-99	PAgL	-0.455	-0.214	0.221
1009-98	PAgL	0.367	-1.221	0.228
002-A1	PAgL	-0.240	0.490	-0.041
10028-99	PAgL	-0.535	-0.617	-0.289
10021-99	PAgL	-0.655	-0.586	-0.037
10048-00	PAgL	0.131	0.261	-0.070
10029-99	PAgL	-0.323	-0.277	-0.096
10066-00	PAgL	-0.607	-0.832	-0.379
10052-00	PAgL	0.820	0.620	0.247
0001-A1	PAgL	-0.668	-0.118	-0.481
10011-98	PAgL	-0.361	-0.716	-0.345
10018-99	PAgL	0.203	0.268	-0.273
10019-99	PAgL	-0.705	-0.512	-0.361
10060-00	PAgL	-0.098	0.123	-0.278
10073-00	PAgL	0.168	0.809	-0.263
011-A1	PAgL	-0.040	0.197	-0.200
10020-99	PAgL	0.352	0.681	-0.152
003-A1	PAgL	-0.668	0.681	-0.244
008-A1	PAgL	-0.414	0.647	-0.302
10024-99	PAgL	0.848	0.647	0.172
10045-00	PAgL	-0.698	-0.381	0.039
1002-05	PAgL	-0.362	0.163	0.212
1005-05	PAgL	0.472	0.028	0.183
10023-99	Saud	-0.086	-0.408	-0.086
10025-99	Saud	-0.068	-0.148	0.415
10053-00	Saud	-0.043	-0.451	0.227
10055-00	Saud	-0.125	-0.385	-0.003
10056-00	Saud	0.462	2.685	0.193
10061-00	Saud	-0.329	-0.625	-0.372
10062-00	Saud	-0.510	-0.640	-0.233
10064-00	Saud	-0.459	-0.278	-0.280
10071-00	Saud	0.435	2.283	0.614
10074-00	Saud	0.341	0.376	-0.060

10075-00	Saud	-0.831	-1.221	-0.164
10077-00	Saud	0.554	0.490	0.116
10079-00	Saud	0.300	0.936	-0.037
10081-00	Saud	0.287	1.156	0.098
10083-00	Saud	0.079	-0.313	0.133
10092-00	Saud	1.008	0.729	0.545
10093-00	Saud	-0.255	-0.605	0.284
1001-05	Saud	-0.308	-0.606	0.420
1003-05	Saud	0.161	-0.118	0.462
1008-05	Saud	-0.172	-0.051	-0.269
1006-05	Saud	-0.447	-0.746	0.183
1007-05	Saud	-0.703	-0.716	-0.492
10010-98	Saud	-0.005	-0.428	-0.106
10043-00	Saud	-0.686	-1.099	-0.406
10063-00	Saud	-0.643	-0.659	-0.394
1004-05	Saud	-0.007	0.412	-0.010
10008-98	Saud	-0.175	-0.208	-0.158
10084-00	Saud	-0.134	-0.110	0.279
10065-00	PC	0.319	0.690	-0.262
10054-00	PC	0.227	0.728	-0.249
10076-00	PC	-0.275	-0.229	-0.389
10091-00	PC	-0.047	0.189	-0.110
10090-00	PC	-0.034	0.064	-0.201
10041-00	PC	0.691	0.644	-0.242
10057-00	PC	-0.101	-0.325	-0.190
10035-00	PC	0.266	0.144	-0.062
10037-00	PC	-0.201	0.506	-0.305
10039-00	PC	-0.103	0.673	-0.121
10034-00	PC	0.394	0.709	-0.357
10003-98	PC	-0.423	-1.191	-0.493
10005-98	PC	0.220	0.892	-0.245
10044-00	PC	-0.346	0.638	-0.371
1002-98	PC	-0.080	0.896	-0.053
1004-98	PC	-0.764	-1.057	-0.311
10058-00	PC	0.090	0.644	-0.348

PAgL-Periodontite Agressiva Localizada, PAgG-Periodontite Agressiva Generalizada, PC-Periodontite Crônica e Saud-Saudáveis.