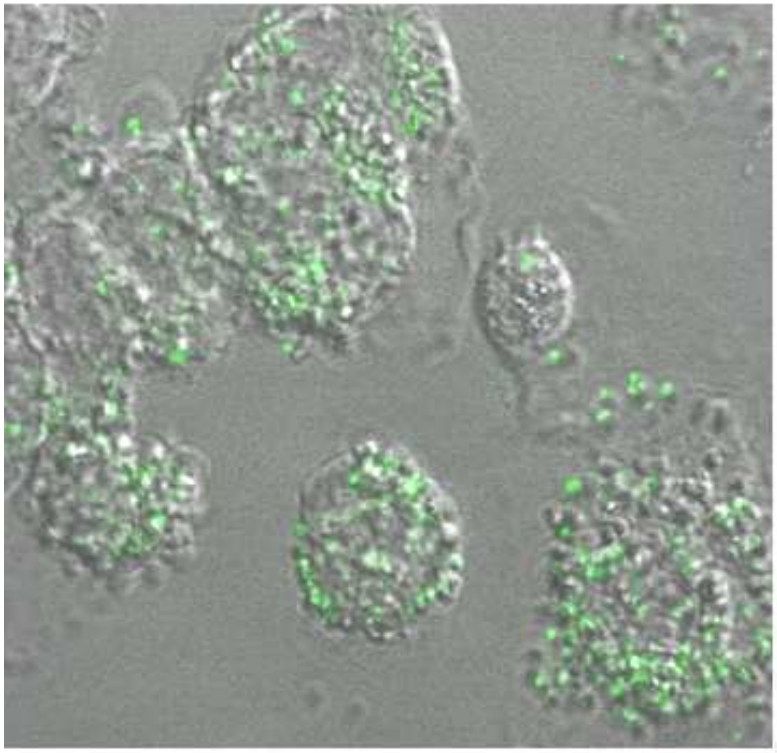
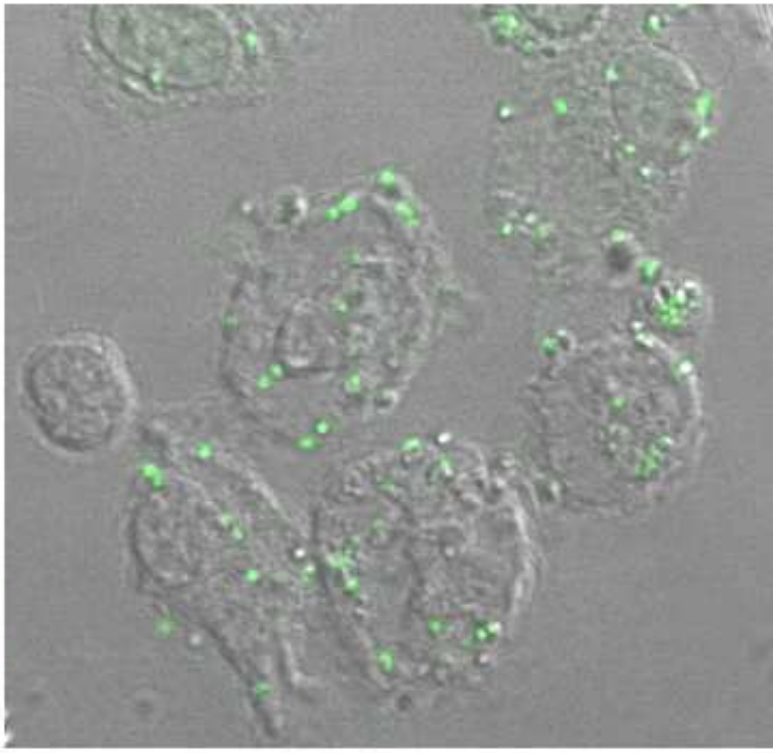
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

Caracterização do papel do receptor do tipo Toll 4 (TLR4) em infecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Hayana Ramos Lima





BAURU – SP
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

Caracterização do papel do receptor do tipo Toll 4 (TLR4) em infecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Disertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, como pré-requisito para a obtenção do título de MESTRE em Odontologia, área de Estomatologia e Biologia Oral.

Aluno: Hayana Ramos Lima
Orientador: Profª Drª Ana Paula Campanelli

Bauru - SP
2009

Lima, Hayana Ramos

L629c Caracterização do papel do receptor do tipo Toll 4 (TLR4) em infecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*/ Hayana Ramos Lima - Bauru, 2009.

134 p. : il. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profª Drª Ana Paula Campanelli

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

Assinatura do autor:

Data:

Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB-USP:
Projeto de pesquisa aprovado em 12 de março de 2008.

Número do protocolo: 002/2008

Hayana Ramos Lima

Dados Curriculares

9 de maio de 1982 Feira de Santana - BA	Nascimento
Filiação	Itamar Nunes Lima Marluce Batista Ramos Lima
2000 - 2005	Graduação em Odontologia pela Universidade Estadual de Feira de Santana.
2007 - Atual	Mestrado em Estomatologia e Biologia Oral, Área de concontração em Biologia Oral, na Faculdade de Odontologia de Bauru/Universidade de São Paulo.

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia e Microbiologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo.
Apoio: FAPESP/CAPES

Dedico este trabalho aos meus amados pais e às minhas irmãs, cujo amor e incentivo esgotam minhas palavras de gratidão.

AGRADECIMENTOS

"As línguas são imperfeitas pra que os poemas existam..."

(Adélia prado)

Minha gratidão e admiração à minha orientadora pela confiança e oportunidade de desenvolver novas habilidades. Esses últimos dois anos foram muito proveitosos para meu crescimento pessoal e profissional, e seu papel nesse processo foi indispensável. Nunca esquecerei a forma cortês com que fui recebida no Departamento de Microbiologia e do clima amistoso e de mútua cooperação que sempre imperou em nosso ambiente de trabalho. Isto certamente é reflexo da personalidade, caráter e liderança da Profª Ana. Paula.

Aos meus queridos colegas de laboratório Carla Sipert, Carollinie Knob, Carolina Morandini, Eduardo Aleixo, Eduardo Belai, Eduardo Clemente, Erivan Schnaider, Milena da Silva, Rafael Matsunari, Rodrigo Nalio, Ronan Jacques, Tatiana Malaspina, Thaís Gasparoto e Valéria Gelani por dividirem a bancada, conhecimentos, risos, favores e por fazerem da nossa rotina dias mais leves e produtivos.

Aos funcionários da disciplina de Microbiologia Dalva Ribeiro, André Luís da Silva, Cláudia Gimenez e Sandra Spin por sua constante solicitude e presteza em servir com excelência nas muitas vezes em que os solicitei.

À secretária do departamento de Ciências Biológicas Vera Rufino pela alegria contagiante e competência.

Ao indispensável suporte técnico prestado por André Luís da Silva, Daniele Ceolin, Márcia Graeff, Tânia Cestari, Thelma Silva e Thiago Dionísio e também aos funcionários do biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru, Luís Silva, Erasmo Silva, Elias Cresta e Richard Simões.

À responsável técnica pelo biotério de animais isogênicos do ICB-USP Regina de Luca pela constante solicitude no fornecimento de animais.

Aos professores Flávio Cardoso, Gustavo Garlet, Sérgio Aparecido, Carlos Ferreira dos Santos sempre solícitos, gentis e com quem muito pude aprender.

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva pelo auxílio na realização deste trabalho.

Ao programa de pós-graduação em Biologia oral, na pessoa do Prof. Dr. Antônio Rodrigues. À Presidente da Comissão de pós-graduação, Profª Drª Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado, e às secretárias Giane Quintela, Letícia Momesso e Margareth Mokarzel. Também ao diretor da Faculdade de Odontologia de Bauru, Prof. Dr. Luís Fernando Pegoraro.

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pela concessão de minha bolsa de estudos e ao Governo do Estado de São Paulo pela excelência da USP e de seu Programa de pós-graduação.

Aos caros colegas da disciplina de Histologia Carlos Eduardo Repeke, Samuel Ferreira, Élcia Silveira, Gabriela Gennaro e Marcela Claudino, sempre espirituosos e gentis.

Aos colegas da pós-graduação Fabiana Néspoli, Camila Quaglio, Ericsson Janolio, Luciana Pinto, Paulo Leal Ronald Zapata, Melina Bortolo, Tatiana Assumpção, Polliana Scaffa, Luciana Franciscone, Luciana Mendonça, Wagner Baseggio, Karin Modena, Flávia Nahsan, Marco Krek, Pâmela Rodrigues, Angélica, Carine Ervolino, Érica Raduan, Núria Castelo Branco, Bruno Furquin.

Às queridas amigas Isabela Caetano, Michelle Alonso e Simone Faustino por dividirmos não apenas a mesma casa, mas também boas conversas, risos, conselhos e saudades. Vocês fazem parte de um capítulo especial de minha vida e levarei em meu coração nossa amizade e as boas lembranças de nossa convivência. À Sra. Neuza Vieira por me receber de forma tão acolhedora e carinhosa em sua casa, muitíssimo obrigada.

Às amigas Camila Porto, Fernanda Ribeiro, Izadora da Balinha e Tatiane Novais pelo incentivo e carinho que fazem da nossa amizade algo tão especial. Obrigada pelas conversas, conselhos, incentivos, lembranças e tantos bons sentimentos. Obrigada por fazerem parte de minha vida.

À família Novais, Júnior e Tatiane, minha especial gratidão pela recepção sempre calorosa e acolhedora em sua casa e vidas. Muito obrigada pelos inúmeros favores e companhia, mas principalmente preciosa amizade.

Ao amigo e primo de coração, Manoel Júnior, por me receber em sua casa com tamanha gentileza, pela amizade e disposição em servir-me. Sinta-se participante desta etapa de minha vida.

Ao querido Thiago Pinheiro pela amizade e companhia tão especiais nesta fase de minha vida.

Aos amigos Paulo Rocha, Marcelo Rios e Lydia Brito pelo incentivo e por despertarem em mim a vontade de ingressar na carreira acadêmica. Também a Alan Araújo por sua constante solicitude e gentileza.

À Comunidade Batista Vida Nova, em Salvador e em Bauru, em especial a Bill e Sue Spoelhof, e às famílias Alvares, Ciola, Figueiredo, Vanini e Murback pela forma acolhedora com que fui recebida nesta igreja.

À minha família pelo amor, cuidado, carinho e afeto sinceros, combustíveis para que suportasse a ausência de suas presenças físicas em minha rotina. Minha eterna gratidão pelas orações e pelo que cada um de vocês representam para mim.

Minhas queridas irmãs Itamara e Yara, o sentimento que nos une é capaz de esvaziar o sentido de todas as boas palavras – nenhuma delas é suficientemente precisa para descrever o amor e admiração que tenho por vocês. Ao meu querido cunhado Robério, obrigada por ser o irmão que a vida me presenteou, por trazer amor, mais melodias, poesias, bons conselhos e tantas mais preciosas coisas aos meus dias.

Aos meus pais, Itamar e Marluce, minhas maiores honras. É um privilégio ser filha de pessoas tão dedicadas, honestas e honradas como vocês. Orgulho-me por tê-los como meus pais, conselheiros e amigos, por acreditarem em meus sonhos e incentivá-los como se fossem seus. Fico lisonjeada com a confiança que vocês depositam em mim. Eu os amo com o mais profundo de minha alma.

A Deus, o Senhor da minha vida, que a cada dia me presenteia com Graça imerecida. Obrigada por cada luta e vitória, por me cercar de pessoas tão especiais, por me cingir de força nas muitas vezes em que elas eram exíguas, por aperfeiçoar os meus caminhos e fazê-los planas veredas.

"...Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu."

(Fernando Pessoa)

RESUMO

Os tecidos periodontais estão em confronto contínuo com microorganismos capazes de disparar mecanismos da resposta imune inata, dando origem ao infiltrado inflamatório. Estudos recentes mostraram a importância dos receptores do tipo Toll (TLRs) na fase inicial de reconhecimento de diferentes patógenos. A participação de receptores tipo Toll (TLRs) na resposta de neutrófilos e macrófagos frente a periodontopatógenos precisa ser determinada. Nesse estudo procuramos caracterizar o infiltrado inflamatório presente no peritônio de animais deficientes de $TLR4^{-/-}$, avaliar a atividade fagocítica, bem como a produção de óxido nítrico (NO) e a atividade de mieloperoxidase (MPO) no curso da infecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. A ausência de TLR4 não influenciou a quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos para o local da infecção, a produção de óxido nítrico, a atividade de MPO e a viabilidade celular. No entanto, neutrófilos e macrófagos de animais $TLR4^{-/-}$ apresentaram menor atividade fagocítica quando comparado ao grupo controle (camundongos WT). Em relação à doença periodontal induzida experimentalmente com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em camundongos deficientes de TLR4, os resultados mostraram que 100% dos animais deficientes de TLR4 sobreviveram à infecção durante o período de observação. Em relação à análise de perda óssea, os dados revelaram uma menor perda progressiva de osso alveolar na região dos molares de animais deficientes de TLR4. A ausência do receptor interferiu na disseminação da bactéria, uma vez que se observou um grande número de bacilos no linfonodo e baço dos animais que não expressaram TLR4, diferente do observado para os animais selvagens (WT). Os resultados indicam a importância da sinalização via TLR4 durante a resposta imune contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans.*

Palavras-chave: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Receptor do tipo Toll 4. Doença periodontal.

ABSTRACT

The role of TLR4 (Toll like receptor 4) in the recognition of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans is an oral gram negative bacteria that contributes to periodontitis progression. Isolated antigens from *A. actinomycetemcomitans* could be activating innate immune cells through Toll-like receptors (TLRs), molecules that recognize structural components conserved among microorganisms. In this study, we evaluated the role of TLR4 in the recognition of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans.* Neutrophils and macrophage from TLR4 deficient mice and WT mice were collected and used for the subsequent assays. The phagocytosis of leukocytes against *A. actinomycetemcomitans* and the presence of apoptotic cells were determined by flow cytometry. The *in vivo* and *in vitro* production of NO and MPO was evaluated 24h after *A. actinomycetemcomitans* challenge. In addition, we examined the mechanisms that modulate the outcome of *A. actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease in TLR4$^{-/-}$ mice. The results show that inflammatory cells influx in peritoneal cavity of TLR4$^{-/-}$ mice was similar to that observed into their littermate controls. The phagocytic activity was diminished by cells from TLR4$^{-/-}$ mice. In addition, we did not observe difference in NO and MPO production and in the frequency of apoptotic cells between cells from TLR4$^{-/-}$ and WT mice. The results showed that TLR4-deficient mice developed less severe periodontitis after *A. actinomycetemcomitans* infection, characterized by significantly lower bone loss and inflammatory cell migration to periodontal tissues. Together, these data demonstrate the role TLR4 signals for neutrophils activation after *A. actinomycetemcomitans* infection and development of periodontal disease.

Key-words: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Toll like receptor 4 (TLR4). Periodontal disease.

Lista de abreviaturas e símbolos

° - graus
g - gravidade
Aa - *Aggregactibacter Actinomycetemcomitans (Actinobacillus actinomycetemcomitans)*
AgAa - *Antígenos sonicados de Aggregactibacter Actinomycetemcomitans*
APCs - Células apresentadoras de antígeno
CCL5 (RANTES) - Quimiocina expressa e secretada por células T normais e regulada após ativação (*Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted)*
CD - Agrupamento de diferenciação (*Cluster of differentiation*)
COA - Crista óssea alveolar
CpG - Citosina ligada à guanina por grupo fosfato.
DO - Densidade óptica
ELISA - Ensaio imuno enzimático
EU - Unidade de endotoxina
FITC - Isotiocianato de fluoresceína
FL - Canal de fluorescência
fmlpR - Receptor para formil-metionil-leucil-fenilalanina
FSC - Parâmetro de análise celular por tamanho (*forward scatter*)
GM-CSF - Fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos
HSP - Proteína do choque séptico
IFN - Interferon
IgG - Imunoglobulina G
IL - Interleucina
JAC - Junção amelo cementária
LFA-1 - Antígeno associado à função linfocitária (β2 integrin lymphocyte function-associated antigen-1)
LPS - Lipopolissacarídeo
Mac-1 - Receptor de macrófagos para integrinas
MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos-1 (*Monocyte chemoattractant protein-1*)
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade
MMPs - Metaloproteinase
MPO - Mieloperoxidase
(CCL2) - Proteína inflamatória de macrófago (*Macrophage inflammatory protein-1α*)
NO - Óxido nítrico
OPG - Osteoprotegerina
PBS - Solução salina tamponada em fosfato
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PI - Iodeto de propídio
PMN - Leucócitos polimorfonucleares
RPMI-1640 - Meio de cultura de células
SSC - Parâmetro de análise celular em citometria de fluxo por granulosidade (*side scatter*)
T_H - Linfócito T auxiliar (helper)

T_{reg} - Linfócitos T reguladores
TLR - Receptores do tipo Toll (*Toll like receptor*)
TNF-α - Fator de Necrose Tumoral α (*Tumor Necrosis Factor*)
TSA - Meio de cultura bacteriano Tryptic Soy Agar
DPs - Doenças Periodontais
SD - Desvio padrão
RANK - Receptor de ativação de NF-κB
RANK-L - Ligante do receptor de ativação de NF-κB
ROI - Intermediários reativos de oxigênio
TCR - Receptor de células T
$TLR4^{-/-}$ - Deficiência do receptor do tipo Toll 4
UFC - Unidade formadora de colônia
WT - Tipo selvagem (*Wild Type*)

Sumário

Introdução **39**

Proposição **53**

Material e Métodos **57**

1. Animais de experimentação 57
2. Cultura de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 57
3. Obtenção dos componentes antigênicos de *A. actinomycetemcomitans* 57
4. Marcação de *A. actinomycetemcomitans* com FITC 58
5. Doença periodontal experimental induzida 58
6. Infecção intraperitoneal 59
7. Isolamento de células inflamatórias 59
8. Cultura de neutrófilos e macrófagos 60
9. Ensaio de fagocitose 60
10. Produção de óxido nítrico 61
11. Atividade de mieloperoxidase 62
12. Apoptose 62
13. Avaliação da perda óssea alveolar maxilar 63
14. Análise histopatológica 63
15. Análise das unidades formadoras de colônias após infecção por *A. actinomycetemcomitans* 64
16. Análise estatística 64

Resultados **67**

1. Susceptibilidade de animais TLR4$^{-/-}$ à infecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 67
2. Ausência de TLR4 reduz perda óssea alveolar induzida por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 67
3. Análise histológica de tecido gengival de animais submetidos à doença periodontal induzida por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 67

4. Disseminação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* após infecção oral é maior em animais TLR4$^{-/-}$ 73

5. Atividade de mieloperoxidase é afetada pela ausência de TLR4 após infecção oral por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 79

6. Ausência de TLR4 não influencia a migração de células inflamatórias para o foco de infecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans.* 79

7. A fagocitose de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por neutrófilos e macrófagos é menor na ausência de TLR4. 83

8. Produção de espécies reativas de nitrogênio após desafio por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* não é influenciada por TLR4. 89

9. A ausência de TLR4 não influencia a atividade de mieloperoxidase após desafio por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans.* 89

10. TLR4 não confere aumento na viabilidade de neutrófilos e macrófagos após infecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans.* 93

Discussão 101

Conclusão....111

Referências 115

INTRODUÇÃO

As doenças periodontais (DPs), alterações inflamatórias crônicas dos tecidos de sustentação dos órgãos dentais, têm sua etiologia relacionada ao biofilme bacteriano aderido à superfície dental (GENCO, 1992; LOESCHE, 1993; KINANE; LAPPIN, 2001). Em termos epidemiológicos, as diferentes modalidades de DP atingem praticamente a totalidade da população, sendo a enfermidade óssea mais prevalente em humanos, e importante causa de perda dentária. Atualmente, as DPs têm sido descritas como fatores modificadores da saúde sistêmica dos pacientes (AAP 1996; PAGE, 1998; AAP 1999; EBERSOLE; CAPPELLI, 2000; SUSIN *et al.* 2004), sendo, portanto, uma doença de relevância para a saúde pública.

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

Embora tal resposta supostamente proteja o hospedeiro da invasão microbiana, a relativa inacessibilidade dos leucócitos e de fatores antimicrobianos aos microrganismos no sulco gengival, somada à proteção conferida por sua organização na forma de biofilme, inviabilizam a eliminação dos agentes infecciosos (EBERSOLE; MA, 1994; PAGE, 1998; EBERSOLE; CAPPELLI; HOLT, 2001; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002; SBORDONE; BORTOLAIA, 2003). Além disso, acredita-se que a presença de diversos microrganismos com grande capacidade de invasão tecidual nos tecidos periodontais propicie sua disseminação pelo organismo. De fato, estudos recentes têm demonstrado que pacientes com DP apresentam uma marcante resposta sistêmica de fase aguda, a qual é controlada após o tratamento periodontal (SLADE *et al.* 2000; NOACK *et al*., 2001; MATTILA *et al*., 2002; D'AIUTO; READY;

TONETTI, 2004). Tal resposta supostamente estaria envolvida na alteração da saúde sistêmica apresentada pelos pacientes com DP. Apesar de certa controvérsia, diversos estudos têm demonstrado que a DP leva à predisposição, agravamento e até mesmo a ocorrência de diversas doenças, como aterosclerose, parto prematuro e infecções respiratórias (EBERSOLE; CAPPELLI, 2000; CRAIG *et al.* 2003; LALLA *et al.* 2003). Entretanto, os mecanismos envolvidos no controle da infecção periodontal, assim como seu grau de influência na saúde sistêmica do hospedeiro, ainda são pouco conhecidos.

As doenças periodontais diferem de outras infecções por não serem causadas por um único microrganismo, mas por um grupo de bactérias. Embora mais de 500 espécies bacterianas possam ser isoladas da cavidade oral, apenas uma pequena fração tem potencial para causar a destruição óssea periodontal. Entre as espécies mais relacionadas com esse quadro estão *Porphyromonas gingivalis, Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Actinobacillus actinomycetemcomitans), Prevotella intermedia, Treponema denticola* (OOSHIMA *et al*., 2003; TIETZE *et al*., 2006; SAKAI *et al*., 2007). Especificamente, as espécies *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* possuem a capacidade de invadir os tecidos periodontais e estabelecer uma infecção (SCHENKEIN, 2006).

Durante o desenvolvimento da resposta imune no periodonto, as primeiras células a entrarem em contato com os microorganismos são as células epiteliais que compõem os epitélios juncional, do sulco e oral. Estas células atuam como barreira física impedindo a invasão do microorganismo e secretam uma gama de peptídeos antimicrobianos, como β-defensinas e catelicidina (DALE; FREDERICKS, 2005; MARSHALL, 2004). As células epiteliais após a interação com o agente agressor têm um papel importante no desenvolvimento da resposta imune por produzirem CXCL8 (IL-8), uma quimiocina que dirige a migração de leucócitos para o sítio da infecção (YOSHIMURA *et al*., 1987; SILVA *et al*., 2007;). De fato, os leucócitos polimorfonucleares (PMN) são as primeiras células a migrarem em direção ao foco inflamatório, compondo a primeira linha de defesa do hospedeiro contra a infecção microbiana. Os neutrófilos são células que desempenham função relevante para defesa do organismo durante uma infecção e a sua importância para o desenvolvimento da doença periodontal vem sendo amplamente estudada. Porém, o equilíbrio na atividade de neutrófilos é essencial para a manutenção da saúde periodontal, uma vez que, estudos

revelam que a hiperatividade ou a deficiência na atividade dessas células são associadas a manifestações severas de periodontite (ATTSTROM, 1975; DEL FABBRO *et al*., 2000; WADDINGTON; MOSELEY; EMBERY, 2000).

Os neutrófilos expressam diversos receptores responsáveis por modularem sua função. A expressão de LFA-1 (CD11a-CD18) e Mac-1 (CD11b-CD18) auxiliam na adesão à superfície endotelial e na diapedese, enquanto que receptores para fração 3 do complemento (C3R) e para porção Fc de imunoglubulinas (FcR); bem como receptores de citocinas, (CXCR8, IL-1R, TNF-αR) atuam na ativação dessas células (NATHAN, 2006; DALE; BOXER; LILES, 2008). Após a ativação, os neutrófilos liberam mediadores inflamatórios e produtos antimicrobianos que permitem o recrutamento e a ativação de outras células do sistema imune (TABUKO *et al*., 1997). Assim, os neutrófilos desenvolvem um papel essencial na imunidade inata contra agentes infecciosos, fornecendo a defesa imediata após o contato com o microrganismo (EICK *et al*., 2000; BUCHMANN *et al*., 2002; GUSTAFSSON *et al*., 2006). Contudo, algumas bactérias como por exemplo, *A. actinomycetemcomitans*, apresentam maior resistência à fagocitose por neutrófilos (PERMPANICH; KOWOLIK; GALLI, 2006) e apresentam menor susceptibilidade à ação de suas defensinas (JI *et al*., 2007), o que favorece sua permanência no sítio da infecção.

Além da atividade fagocítica, os neutrófilos são capazes de produzir inúmeros agentes antimicrobianos, que permanecem armazenados em seus grânulos primários ou azurófilos sendo a elastase, catepsina G, protease 3, azurocidina e mieloperoxidase os fatores mais relevantes; em seus grânulos secundários (específicos) e terciários a lactoferrina, lipocalina, lisozima, MMP8, MMP9 e MMP25 são os agentes antimicrobianos mais relevantes (NATHAN, 2006). Essas células promovem uma redução não mitocondrial do oxigênio para formar intermediários reativos de oxigênio (ROIs) que incluem ânion superóxido, oxigênio singleto, ozônio, peróxido de hidrogênio, cloraminas e radicais hidroxila que também representam importantes produtos microbicidas dos neutrófilos. Assim, após a ingestão de microrganismos patogênicos, inúmeros mecanismos podem ser desencadeados no interior dos neutrófilos para a eliminação do agente agressor. O mecanismo oxigênio-independente inclui a liberação de peptídeos e proteínas dos grânulos como proteína bactericida de permeabilidade aumentada (BPI), defensinas e catelisinas. Estas proteínas são

catiônicas e a carga positiva provavelmente medeia a ligação inicial ao microrganismo, visto que na maioria das vezes as estruturas da superfície bacteriana são aniônicas (BRINKMANN; ZYCHLINSKY, 2007). Nos mecanismos oxigênio-dependentes, os neutrófilos ativados sofrem uma explosão de consumo de oxigênio, que é convertido por NADPH-oxidase ligada à membrana em ânion superóxido, um precursor para várias espécies reativas de oxigênio, especialmente peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A mieloperoxidase usa H_2O_2 e ubiquitiniza íons cloreto para gerar ácido hipocloroso (HOCl), um oxidante altamente tóxico (BELAAOUAJ, 2002).

A mieloperoxidase (MPO) é produzida no estágio pré-mielócito e armazenada nos grânulos primários de neutrófilos (KLEBANOFF, 2005). No foco da infecção, a MPO é liberada nos fagossomos e participa da degradação da bactéria. A MPO contribui na defesa do hospedeiro e também é capaz de limitar oxidativamente a elastase, controlando assim possíveis danos teciduais provocados pela liberação da elastase (BELAAOUAJ, 2002). Enzimas que inativam o peróxido de hidrogênio, como a catalase produzida por *A. actinomycetemcomitans,* protegem o microrganismo da ação microbicida do peróxido de hidrogênio, e conseqüentemente, da ação microbicida dos neutrófilos (MANDELL, 1975). A presença de MPO em tecidos periodontais doentes tem sido relatada em diversos estudos, mas normalmente investigada como um marcador do nível de inflamação local (YAMALIK *et al.*, 2000; LISKMANN *et al.* 2004; KANER *et al.*, 2006; BORGES-JR. *et al*., 2007; SAKAMOTO *et al.*, 2008;).

Em indivíduos com DP, os neutrófilos geralmente apresentam maior resistência a apoptose (GAMONAL *et al*., 2003; MURRAY; WILTON, 2003; TURINA *et al.*, 2005). A maior viabilidade e o aumento na atividade destas células, através da produção de enzimas como, por exemplo, mieloperoxidase e metaloproteinases, é capaz de gerar estímulos deletérios aos tecidos do organismo e, conseqüentemente, perda da integridade das estruturas de suporte dos dentes, observada em estágios mais avançados da DP (BUCHMANN *et al.*, 2002; SMITH *et al*., 2004; KLEBANOFF, 2005; GUSTAFSSON *et al*., 2006; UJIIE *et al*., 2007; EL-KEBIR *et al*., 2008; SHIN; JI; CHOI, 2008; UJIIE *et al*., 2008).

Como um componente chave da resposta imune inata, os neutrófilos são importantes no recrutamento e ativação das células apresentadoras de antígeno (APCs),

gerando sinais quimiotáticos que atraem monócitos para o foco da infecção (NATHAN, 2006).

À medida que a infecção se estabelece, as células epiteliais da camada basal, fibroblastos e células endoteliais produzem CCL2 (MCP-1), uma quimiocina que induz a migração de macrófagos para o sítio da infecção (TONETTI *et al*., 1994; YU; GRAVES, 1995; SILVA *et al*., 2007). Nas doenças periodontais, os macrófagos são encontrados em número substancial tanto na gengivite como na periodontite crônica e possuem um importante papel na eliminação dos patógenos e na produção de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 e TNF-α, que auxiliam a resposta imune (BAKER, 2000; KINANE; LAPPIN, 2001; GRAVES; COCHRAN, 2003; YOUNES *et al*., 2008; MOSSER; EDWARDS, 2008). Adicionalmente, os macrófagos também apresentam um papel importante no desenvolvimento da resposta imune por apresentarem antígenos para os linfócitos T. Com isso, especula-se a respeito de uma possível falha na ativação dos macrófagos nas doenças periodontais (CHAPPLE; SRIVASTAVA; HUNTER, 1998; LAPPIN *et al.,* 1999), o que poderia influenciar o perfil de ativação das células T durante o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva. Macrófagos são células multifuncionais: possuem atividade fagocítica, apresentam capacidade de secretar uma série de produtos moleculares bem definidos, biologicamente ativos (ADAMS; HAMILTON, 1984; NATHAN; MURRAY; COHN, 1980) e também estão envolvidos no processamento e apresentação de antígenos a linfócitos T (PIERCE, 1980; ROSENTHAL, 1980) e contribuem para a regulação da resposta imune específica (DOHERTY, 1995). A capacidade de fagocitar e digerir material estranho é uma das suas primeiras atividades destas células e estes processos têm sido extensivamente estudados *in vitro* (STOSSEL, 1974; STOSSEL, 1975; DALE; BOXER; LILES, 2008; MOSSER; EDWARDS, 2008).

O principal mediador antimicrobiano produzido pelos macrófagos é o óxido nítrico (NO) (BOGDAN, 2002). O NO é um radical livre produzido a partir do aminoácido L-arginina através da ação de isoenzimas, globalmente denominadas NO sintases (NOS) (TRIPATHI *et al*., 2007). Três diferentes isoformas são conhecidas: NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) e NOS induzível (iNOS). A eNOS e nNOS são constitutivas ou basais e produzem baixas concentrações de NO por um curto período de tempo. Contudo, a iNOS, identificada em vários tipos celulares como macrófagos e PMNs, é expressa em resposta a estímulos

inflamatórios, tais como IL-1, TNF-α, IFN-γ e LPS, sendo produzida em altas quantidades e por longo período de tempo (BOGDAN, 2002). Quando o NO é localmente produzido em altas concentrações, pode agir como molécula citotóxica ou citostática contra células infectadas por fungos, bactérias, protozoários, bem como células tumorais e células próximas à região de produção de NO, podendo resultar em extensa destruição tecidual (BROGDAN, 2002).

A expressão da enzima iNOS, bem como a produção de NO, se encontram elevadas no periodonto em estado de doença (MATEJKA *et al.,* 1998; LAPPIN *et al*., 2000; HIROSE *et al.,* 2001; BATISTA *et al*., 2002). No microambiente da doença periodontal, a presença de estímulos inflamatórios capazes de induzir a produção de NO por células inflamatórias é bem estabelecida (WALH *et al*., 1988; HIROSE *et al*., 2001; YANAGITA *et al.*, 2002). A presença de altas concentrações de L-arginina e L-citrulina em tecido gengival inflamado e a expressão de iNOS em macrófagos e PMNs em periodontites induzidas experimentalmente em ratos, bem como em fibroblastos, células epiteliais, macrófagos e células endoteliais em periodontite humana, revelam a possível participação do NO na doença periodontal. Estudos também demonstram que LPS de bactérias periodontopatogênicas tem a capacidade de estimular a síntese de NO em células humanas e murinas (BLIX; HELGELAND, 1998; JO *et al.*, 2006; SOSROSENO. *et al*., 2002; SOSROSENO, WIHASKORO; HERMINAJENG, 2002; SOSROSENO *et al*., 2008) e que a ausência de iNOS leva ao aumento na susceptibilidade à infecção por *P. gingivalis* em um modelo de infecção em câmara subcutânea em camundongos (GYURKO*,* 2003). Adicionalmente, a capacidade dos PMNs humanos de expressar iNOS, bem como sintetizar e secretar NO, foi evidenciada *in vivo* e *in vitro* a partir de amostras de lesões periapicais inflamatórias crônicas e também nos exsudados inflamatórios coletados de sítios com reabsorção óssea alveolar e inflamação crônica.

Todos os eventos descritos acima são desencadeados após o reconhecimento do patógeno. O reconhecimento inicial de microrganismos é mediado por receptores celulares expressos em células da imunidade inata. As interações entre componentes da parede celular do patógeno e receptores homólogos presentes na membrana celular de neutrófilos e macrófagos modulam a fagocitose e a ativação celular (HASLETT *et al*, 1994; GAMONAL *et al*., 2001). Monócitos, macrófagos e neutrófilos são células da imunidade inata que

expressam receptores de superfície para manose, componentes do sistema complemento, porção Fc de moléculas de imunoglobulinas e receptores semelhantes à Toll (TLR, *Toll-like receptor*) capazes de reconhecer produtos microbianos. A ativação celular via esses receptores leva à estimulação da fagocitose, atividade microbicida e produção de citocinas (GREEN *et al.*, 1981). A capacidade das células da imunidade inata em reconhecer uma diversidade de produtos microbianos potencializa a produção de padrões distintos de citocinas frente à estimulação por diferentes microrganismos (SPRINGER *et al.*, 1994). Entretanto, a doença periodontal difere de outras infecções por não ser causada por uma única espécie bacteriana, mas por um conjunto de bactérias, composto tanto por bactérias gram-negativas quanto gram positivas, o que poderia influenciar o perfil de ativação de macrófagos e neutrófilos e, conseqüentemente, a resposta imune inata gerada no local da lesão.

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

Estudos recentes mostraram a importância de TLRs na fase inicial de reconhecimento de diferentes patógenos. Receptores do tipo *Toll* -1, -2, -4, -5, e -6 são expressos na superfície celular e possuem a função de reconhecer especificamente produtos bacterianos, incluindo as lipoproteínas bacterianas (TLR2 como um heterodímero com TLR1 ou TLR6), LPS (TLR4), ou flagelina (TLR5) (TAKEDA; AKIRA, 2004). Os receptores TLR -3, -7, -8, e -9 são

localizados nos compartimentos intracelulares (AHMAD-NEJAD *et al.*, 2002; HEIL *et al.*, 2003; MATSUMOTO *et al.*, 2003) e atuam especificamente na detecção de DNA dupla fita (TLR3), RNA viral (TLR7), ou seqüências CpG de bactérias e vírus (TLR9) (TAKEDA; AKIRA, 2004). Os neutrófilos humanos expressam o mRNA para todos os TLRs, exceto TLR3 (NEUFERT *et al.*, 2001), e sua interação com os respectivos ligantes leva à secreção de citocinas inflamatórias (AAP, 1996; ADA, 1996; DONGARI-BAGTZOGLOU; EBERSOLE, 1996; MEYER; FIVES TAYLOR, 1998; AAP, 1999; BECK *et al*., 1999; HUJOEL *et al.*, 2000; LI *et al.,* 2000; SOIKKNEN *et al.* 2000; FOWLER; BREAULT; CUENIN, 2001; TERPENING *et al*. 2001; SHIMAZAKI *et al*. 2001) com exceção da seqüência CpG, que requer o pré-tratamento dos neutrófilos com GM-CSF (NEUFERT *et al.*, 2001). Adicionalmente, o DNA bacteriano pode ativar os neutrófilos via TLR-9 de uma maneira CpG independente, mecanismo este que ainda precisa ser identificado (TREVANI *et al.*, 2003).

A estimulação por bactérias e fungos através de TLR4 é capaz de mediar a indução de citocinas pró-inflamatórias enquanto o reconhecimento desses microrganismos por TLR2 conduz principalmente à liberação de citocinas antiinflamatórias (AKIRA; TAKEDA, 2004). Assim, é provável que os diferentes componentes de parede celular dos microorganismos liguem-se aos seus respectivos TLR, modulando a expressão de diferentes padrões de citocinas após o contato entre a bactéria e a célula hospedeira, tais como TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 (VESCHIARELLIA *et al.*, 1999; XIONG *et al.*, 2000; PARISE-FORTES, 2000), demonstrando que essas células podem ser fontes importantes de citocinas, após a interação com microrganismos.

Uma das ferramentas para estudo do papel de TLR4 *in vivo* são os camundongos das linhagens C57BL/10ScCr e C3H/HeJ. Esses animais são pouco responsivos ao LPS pela ausência do gene de TLR4, em animais C57BL/10ScCr, ou por mutação, em animais C3H/HeJ (POLTORAK *et al.*, 1998). A constatação de que animais C3H/HeJ são naturalmente mais resistentes ao LPS, quando comparados a outros camundongos de diferentes linhagens, intrigou a comunidade científica há algumas décadas (SULTZER, 1968). A descoberta de que o receptor TLR4 é responsável pelo reconhecimento de LPS permitiu o seqüenciamento desse gene em animais C3H/HeJ, C3H/HeN (responsivos a LPS), ratos e em humanos, quando, então, se observou a presença de um único ponto de mutação em animais C3H/HeJ,

em que há a substituição de um aminoácido durante a expressão do receptor, tornando seus domínios intracelulares de sinalização não funcionais (POLTORAK *et al.*, 1998; AKIRA; TAKEDA, 2004).

Embora o papel de TLR4 na imunidade inata seja alvo de extensivo estudo, TLR4 pode também ser ativado por ligantes endógenos, produto de células eucarióticas, como proteínas do choque séptico (HSP) e fragmentos de fibronectina e componentes da matriz extracelular (OKAMURA *et al*., 2001; TERMEER *et al.*, 2002; AKIRA; TAKEDA, 2004). O reconhecimento desses ligantes endógenos relaciona-se à progressão de doenças cardiovasculares como infarto do miocárdio e formação de placas ateromatosas nos vasos sanguíneos (PRYSHCHEP *et al*., 2008; ZOU *et al.*, 2008).

Há uma ampla distribuição da expressão de TLR nas células dos tecidos periodontais, com predominância da TLR-2 e -4, que podem ser detectados em células epiteliais, células dendríticas, em fibroblastos da gengiva e do ligamento periodontal, cementoblastos, osteoblastos, osteoclastos e endotélio dos vasos sanguíneos que irrigam a região (MAHANONDA; PICHYANGKUL, 2007). Nas células do epitélio oral, há também considerável expressão de TLR-3, -5 e -9 (MAHANONDA; PICHYANGKUL, 2007) (MILWARD *et al.*, 2007).

Dentre os diversos tipos de TLR, o do tipo 4 parece desempenhar importante papel no desenvolvimento da doença periodontal, uma vez que este receptor é capaz de reconhecer LPS, antígeno presente nas bactérias gram-negativas (KIKKERT *et al.*, 2007; SUN *et al*., 2008). Polimorfismos em TLR4 estão associados à maior freqüência de formas agressivas (FUKUSAKI *et al*., 2007) e crônicas (JAMES *et al*., 2007) da doença periodontal. Além disto, indivíduos com periodontite apresentam significativo aumento na expressão de TLR-2, -4, -7 e -9 do que aqueles acometidos por gengivite (KAJITA *et al*., 2007). Estudos sobre o papel deste receptor no desenvolvimento da doença periodontal revelam que animais deficientes de TLR4 apresentam menor concentração de células RANKL positivas nos tecidos periodontais (NAKAMURA *et al*., 2008), menor indução da diferenciação de células da medula óssea desses mesmos animais em osteoclastos (ITO *et al.*, 1996) e reduzida perda óssea induzida por periodontopatógenos ou LPS de *A. actinomycetemcomitans*, (HOU; SASAKI; STASHENKO, 2000; NAKAMURA *et al.*, 2008). A ativação de neutrófilos e macrófagos também está sob influência de TLR4, já que, na ausência desse receptor e frente ao estímulo

de LPS, há baixa produção de TNF-α e de espécies reativas de oxigênio (REMER; BRCIC; JUNGI, 2003; TSAN *et al*., 2001).

Apesar dessas evidências, o exato papel dos TLRs no desenvolvimento da doença periodontal ainda não foi estabelecido. Poucos são os relatos sobre a interação de *A. actinomycetemcomitans* e TLR4 (TIETZE, *et al.*, 2006). Desta forma, o papel dos TLRs na atividade fagocítica e microbicida de neutrófilos e macrófagos contra a infecção por *A. actinomycetemcomitans* e outros periodontopatógenos ainda precisa ser esclarecido.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans é uma das espécies de bactéria relacionadas a formas agressivas de doença periodontal (HAUBEK, DORTE *et al*., 2008) (SCHACHER *et al*., 2007). O *habitat* desta bactéria é a cavidade oral, sendo possível isolá-la do biofilme supra e subgengival, mucosa mastigatória, saliva, gengiva, língua, palato e tonsilas de indivíduos saudáveis ou com DP (MULLER *et al.*, 2001). Detecta-se também a presença de *A. actinomycetemcomitans* em infecções não orais como endocardites, infecções pulmonares, renais, abscessos epiteliais e osteomielites (WINKELHOFF; SLOTS, 1999).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans é um bacilo gram-negativo, anaeróbio facultativo, incapaz de formar esporos (HENDERSON *et al.*, 2002). Tais bactérias formam, sobre ágar, colônias com forma estelar (do grego *aktinos)* e algumas cepas apresentam a capacidade de adesão aos componentes da matriz extracelular como colágeno e fibronectina, devido à abundante concentração de fímbrias em sua membrana (MINTZ; FIVES-TAYLOR, 1999).

Atualmente são conhecidos 6 sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* (a-f), classificados de acordo com diferenças na estrutura de seus lipopolissacarídeos (KAPLAN *et al*., 2001). O sorotipo b é comumente encontrado em pacientes com doença periodontal ativa (YANG *et al*., 2004) e a cepa JP2 deste sorotipo apresenta grande capacidade de virulência (HAUBEK *et al*., 2008) pela marcante produção de leucotoxina (HAUBEK; POULSEN; KILIAN, 2007).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans expressa diversos fatores de virulência que atuam na inativação ou evasão da resposta imune do hospedeiro, sendo o mais estudado a leucotoxina (HENDERSON *et al.*, 2002). A leucotoxina liga-se seletivamente a leucócitos humanos através do receptor para β2-integrinas, especificamente na subunidade CD18,

induzindo a morte dessas células por apoptose (DILEEPAN *et al.*, 2007; KACHLANY; FINE; FIGURSKI, 2000). Os mecanismos de indução da morte de leucócitos por leucotoxina incluem o aumento no influxo de cálcio para o interior da célula, levando a alterações na função mitocondrial (KOROSTOFF *et al.*, 2000), e aumento na atividade de caspases 1 e 3 (DILEEPAN *et al.*, 2007; KELK *et al*., 2003). A leucotoxina é também capaz alterar a função fagocítica de neutrófilos e de promover sua degranulação e aumento na produção de MMP-8 (CLAESSON *et al*., 2002) (PERMPANICH; KOWOLIK; GALLI, 2006). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* também expressa proteínas capazes de se ligarem à porção Fc de anticorpos, o que pode dificultar seu reconhecimento por células inflamatórias após opsonização (MINTZ, KEITH; FIVES-TAYLOR, 1994).

Outra característica que confere aumento em seu poder de virulência e evasão à resposta imune é a capacidade de *A. actinomycetemcomitans* de colonizar células epiteliais (MEYER *et al.*, 1999; SREENIVASAN; MEYER; FIVES-TAYLOR, 1993). Embora não apresentem estruturas como flagelos que lhe confiram mobilidade, essas bactérias são capazes de deslocarem-se de uma célula a outra através do citoesqueleto da célula hospedeira (MEYER *et al.*, 1999). Outros fatores de virulência de *A. actinomycetemcomitans* são capazes de promover reabsorção do osso alveolar de suporte através do aumento da diferenciação de osteoclastos (KIRBY *et al*., 1995) e indução de apoptose em células osteoblásticas (YAMAMOTO *et al.*, 1999).

Uma vez que *A. actinomycetemcomitans* é uma das bactérias amplamente relacionadas à doença periodontal e que o LPS por elas expresso apresenta importante papel na ativação de células inflamatórias, é importante que se estude a modulação do receptor do tipo Toll 4 na progressão desta doença. A compreensão da função de células centrais na ativação do sistema imune inato e adaptativo, como neutrófilos e macrófagos, é relevante para que se entenda o desenvolvimento e progressão da doença periodontal.

PROPOSIÇÃO

O objetivo principal deste trabalho foi caracterizar o papel dos receptores do tipo Toll 4 após infecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Especificamente, os objetivos foram analisar:

1. A participação de neutrófilos e macrófagos no curso da infecção por *A. actinomycetemcomitans*;
2. A atividade fagocítica de neutrófilos e macrófagos após a infecção por *A. actinomycetemcomitans*;
3. A produção de mediadores microbicidas após a estimulação com *A. actinomycetemcomitans*;
4. O papel do receptor TLR4 em conferir resistência ou susceptibilidade à doença periodontal induzida por *A. actinomycetemcomitas* em animais deficientes deste receptor e as implicações sistêmicas desta infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos machos C3H/HePas (WT) e C3H/HeJ ($TLR4^{-/-}$) que apresentam mutação no gene do receptor do tipo Toll 4, com quatro a seis semanas de vida. Tais animais foram criados no biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, em microisoladores com temperatura e iluminação controladas. A água, ração e maravalha eram autoclavadas e disponibilizadas *ad libitum*. A pesquisa foi autorizada pelo Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru (CEEPA-Proc. nº 002/2008).

2. Cultura de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Amostras de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans,* clone JP2, foram obtidas junto ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e cultivadas no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Bauru em meio TSA (*Tryptic Soy Agar*, DIFCO, Becton Dickson Company, San Jose, EUA) acrescido de 0,6% de extrato de levedura (DIFCO, Becton Dickson Company, San Jose, EUA). As culturas foram mantidas em jarra de microaerofilia com aproximadamente 5 a 10% de CO_2 em estufa a 37°C por 7 dias. A morfologia das bactérias foi confirmada por coloração de Gram e por visualização em estereoscópio (Wild Heerbrugg, Suíça). A pureza das colônias foi confirmada por teste bioquímico da catalase e por reação em cadeia da polimerase (PCR). A concentração de bactérias utilizada nos experimentos foi determinada com o auxílio da escala de MacFarland e ajustadas em espectrofotômetro (Ultraspec 1000, Pharmacia Biotech, Westerville, EUA) com comprimento de onda de 660λ.

3. Obtenção dos componentes antigênicos de *A. actinomycetemcomitans*

Para a obtenção dos componentes antigênicos, colônias de *A. actinomycetemcomitans* foram coletadas, dissociadas e lavadas três vezes em PBS estéril. Em seguida, as bactérias foram rompidas por vibração ultra-sônica a 100W por 1 minuto em banho de gelo. Este procedimento foi repetido 30 vezes, até se obter um alto grau de ruptura das bactérias, o

qual foi verificado através de análise microscópica. Por último, os lisados de bactérias foram centrifugados a 12.000*g* por 20 minutos a 4°C para remoção das bactérias não degradadas. A dosagem de proteínas foi realizada utilizando o método de Lowry (LOWRY *et al*., 1951). Para a estimulação das culturas das células peritoneais foi utilizada uma concentração de 0,5 µg/mL de lisado de *A. actinomycetemcomitans* (Ag*Aa*).

4. Marcação de *A. actinomycetemcomitans* com FITC

Aggregatibacter actinomycetemcomitans foi marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), como descrito previamente (PERMPANICH; KOWOLIK; GALIL, 2006), para a realização dos ensaios de fagocitose. Brevemente, 5 mL da suspensão de *A. actinomycetemcomitans* ($2x10^9$ bactérias/mL) foi incubado com 0,1 mg/mL FITC diluído em PBS (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) por 6 horas a 37°C. Em seguida, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 350*g*. O precipitado foi ressuspenso em 1 mL de PBS e alíquotas foram analisadas em microscopia de fluorescência para a confirmação da marcação das bactérias com FITC. As bactérias foram marcadas e este processo não afetou a viabilidade do microrganismo.

5. Doença periodontal experimental induzida

O modelo de doença periodontal experimental induzida foi baseado no protocolo utilizado por GARLET (2004) com algumas modificações. O protocolo de indução de doença periodontal consistiu da inoculação oral de $1x10^8$ UFC de *A. actinomycetemcomitans* em 50 µL de PBS, acrescida de 2% de carboximetilcelulose, sendo esta suspensão aplicada diretamente na cavidade oral dos animais com o auxílio de um micropipetador automático. Após 24 e 48 horas, o procedimento de inoculação foi repetido. A adição de carboximetilcelulose à suspensão de bactérias possibilita a retenção temporária dos microrganismos e a colonização da cavidade oral por *A. actinomycetemcomitans*; eliminando a necessidade da injeção direta das bactérias dentro do tecido periodontal ou uso de ligaduras, que podem resultar em trauma mecânico ao tecido. Grupos de camundongos C3H/HePas (WT) e C3H/HeJ ($TLR4^{-/-}$) receberam a inoculação de *A. actinomycetemcomitans*

simultaneamente, sendo denominados de “infectados”. Os grupos controle consistiam de animais “sham-não infectados” (os quais recebiam a administração oral de 50 μL de uma solução 2% de carboximetilcelulose em PBS, com metodologia semelhante à descrita para o grupo anterior). A hidratação e alimentação dos animais foram limitadas por 30 minutos depois da inoculação oral das bactérias para garantir sua maior adesão à superfície dental.

A sobrevida dos animais foi monitorada durante o curso da infecção e os sacrifícios foram realizados após 3, 7, 10, 30 e 60 dias de infecção oral. Foram coletadas amostras de gengiva, linfonodo cervical, baço, coração, pulmão, fígado e rim para análise da presença de UFC de *A. actinomycetemcomitans* e da atividade de MPO nesses órgãos. Também foram obtidas amostras das maxilas e dos tecidos periodontais para análise da perda óssea e das alterações histológicas das estruturas de suporte dos dentes.

6. Infecção intraperitoneal

Os animais foram inoculados por via intraperitoneal com $2x10^9$ bacilos viáveis de *A. actinomycetemcomitans* diluídos em 1 mL de PBS estéril. Como controle, os animais foram inoculados com 1 mL de PBS estéril, no qual a concentração de LPS era inferior a 0,125 EU/mL, de acordo com ensaio Limulus (LAL Pyrogent Plus, Cambrex, Walkersville, USA).

7. Isolamento de células inflamatórias

Após 24 horas de infecção peritoneal, os animais foram eutanaziados e as células do exsudado inflamatório foram coletadas através da lavagem da cavidade peritoneal com RPMI (RPMI 1640, GIBCO, Invitrogen Corporation, Grand Island, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB). A suspensão de células obtidas foi centrifugada (350*g*/ 10 minutos/ 4°C) e o precipitado formado foi ressuspenso em 1 mL de meio. O exsudado inflamatório foi analisado através da evidenciação com solução de Turk e contagem diferencial de neutrófilos e macrófagos em câmara de Neubauer.

Paralelamente, os animais WT e $TLR4^{-/-}$ foram inoculados com 1 mL de tioglicolato 3% estéril, por via intraperitoneal, para o isolamento de neutrófilos (6 horas) e macrófagos (72

horas). Após estes períodos, os animais foram sacrificados e as células do exsudado inflamatório peritoneal foram obtidas e caracterizadas como descrito acima.

8. Cultura de neutrófilos e macrófagos

Os neutrófilos e macrófagos obtidos do exsudado peritoneal de animais inoculados com tioglicolato foram cultivados em placas de 24 poços (10^6 células/poço) contendo 1 mL de RPMI suplementado com 5% de SFB. As células foram estimuladas na ausência ou presença de *A. actinomycetemcomitans* viável (1 célula: 10 bacilos), antígeno de *A. actinomycetemcomitans* (5 µg/mL) e LPS de *Escherichia coli* (25 ng/mL). Após o cultivo, os sobrenadantes foram colhidos, centrifugados (350*g/* 10 minutos /4°C), filtrados em membrana de poro 0,22 mm e estocados a -20°C até o uso (para dosagem de óxido nítrico).

9. Ensaio de fagocitose

Foi avaliada a capacidade de fagocitose *in vivo* das células obtidas do exsudado peritoneal após inoculação de *A. actinomycetemcomitans*. Estas células ($1x10^5$ células) foram dispostas sobre uma lamínula de vidro (22 x 22 mm) e mantidas por 30 minutos em incubadora de CO_2, quando foram fixadas com metanol. As células foram coradas com *May-Gruwald* por 40 minutos e após este período o excesso de corante foi removido através de lavagem com PBS. Posteriormente, as lamínulas foram coradas com *Giemsa* pelo mesmo período e o corante novamente removido pela lavagem com PBS. As lamínulas foram montadas com meio de montagem sobre lâminas de vidro e a contagem das células em atividade fagocítica foi realizada de acordo com protocolo de Gasparoto *et al.* (2004). Brevemente, foram escolhidos dez campos aleatórios para contagem das células em fagocitose, observadas em microscópio óptico (aumento de 1000 vezes), fazendo-se a contagem diferencial entre macrófagos e neutrófilos.

Para análise da atividade fagocítica *in vitro*, os neutrófilos e macrófagos obtidos do exsudado peritoneal após inoculação com tioglicolato foram estimulados com *A. actinomycetemcomitans* previamente marcado com FITC. As células ($1x10^6$ células) foram

estimuladas com as bactérias (1 célula: 10 bacilos), por 1 hora em placas de 24 poços e após este período, foram transferidas para um tubo de polipropileno, centrifugadas (350*g* por 10 minutos a 4°C) e ressuspensas em 200 µL de PBS a fim de eliminar bactérias não fagocitadas. O ensaio foi analisado através de citometria de fluxo (FACsorting, Becton and Dickson, San Jose, EUA) utilizando os canais de fluorescência 1 (FL1) para bactéria marcada com FITC. As análises foram feitas usando programas Cell Quest (Becton and Dickson, San Jose, EUA) e Flow Jo 5.7.2 (TreeStar Inc., Ashland, EUA) os quais permitem analisar todas as células adquiridas (10000/ amostra) ou apenas determinadas populações, individualizadas por janelas (ou *gates*) estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL) (CAMPANELLI *et al*., 2003).

As células obtidas do exsudado peritoneal foram também estimuladas com *A. actinomycetemcomitans*-FITC sobre lamínulas de 22 x 22 mm. Após 1 hora, as lamínulas foram cuidadosamente lavadas com RPMI 5% SFB, montadas em lâminas de vidro e analisadas em microscópio confocal, em objetiva de 63x e zoom de 3x (Leica TCS-SPE, Mannhein, Alemanha).

10. Produção de óxido nítrico

Foi mensurada a produção de óxido nítrico pelas células peritoneais isoladas após infecção com *A. actinomycetemcomitans.* O exsudado inflamatório obtido após lavagem peritoneal foi centrifugado e o sobrenadante obtido foi armazenado a -20°C. A produção de óxido nítrico foi também mensurada a partir do sobrenadante das culturas de neutrófilos e macrófagos através da reação colorimétrica de Griess.

Para a reação colorimétrica de Griess (ELAHI *et al.*, 2001), 50µL das amostras foi adicionado a 50µL de reagente de Griess e incubados por 30 minutos a 26°C. Em seguida, determinou-se a absorbância (filtro de 450 nm) em leitor de ELISA (Microplate reader, 680, Bio-Rad, Hercules, EUA). Os resultados foram expressos em µmoles e determinados pela comparação com a curva padrão (realizada com nitrito de sódio nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 e 1.5 mM).

11. Atividade de mieloperoxidase

A atividade de MPO dos órgãos coletados após inoculação oral de *A. actinomycetemcomitans* e dos neutrófilos peritoneais e mantidos em cultura foi mensurada de acordo com protocolo descrito por Garlet *et al.* (2007). Brevemente, as amostras foram obtidas, pesadas e armazenadas em solução tampão contendo NaCl (1,0M), $NaPO_4$ (0,02M), NaEDTA (0,015M) a -20°C e posteriormente homogeneizadas (UltraTurrax 8.0; IKA, Staufen, Alemanha) O homogenato foi centrifugado a 350*g* por 15 minutos, sendo então submetido a choque hipotônico com 1 mL de NaCl 0,2%. As amostras foram novamente centrifugadas, o pellet foi ressuspenso em tampão de $NaPO_4$ (pH 5,4) e H-TAB (0,5 g/mL) e novamente homogeneizado e centrifugado a 12.000*g* por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi utilizado na determinação da atividade de MPO.

A atividade da mieloperoxidase foi mensurada após incubação de 10 µL da amostra, diluída em 40 µL de $NaPO_4$ 0,08M, com 50 µL de H_2O_2 0,5mM e tetrametilbenzidina (1,6 mM). A atividade de mieloperoxidase das amostras foi avaliada em leitor de ELISA com uma absorbância de 450 nm e ajustada de acordo com curva padrão para a atividade de $1x10^4$ neutrófilos ou pela densidade óptica (DO) de cada amostra em relação à sua massa.

12. Apoptose

A análise de apoptose nas suspensões celulares foi feita por citometria de fluxo através da utilização de anexina V incorporada à FITC como um ligante para a fosfatidilserina expressa somente nas células apoptóticas. A detecção de apoptose através da ligação de anexina V foi realizada empregando-se um “kit” comercial (Southern Biotech, R&D systems, Birmingham, EUA). Para tanto, as células a serem analisadas, $1x10^5$ células, foram lavadas em PBS (4 °C), transferidas para tampão com alta disponibilidade de Ca^{++} (denominado tampão de ligação), e então incubadas com Anexina-FITC (10 µL/mL) juntamente com iodedo de propídeo (PI) (50 mg/mL) para exclusão das células necróticas. Essa reação foi realizada em um volume de 100 µL em tubo de polipropileno e as células foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. Ao final do tempo de incubação, as células foram centrifugadas (350*g*, por 5 minutos a 4°C), ressuspensas em 300 µL do tampão de ligação e

submetidas à análise através de citômetro de fluxo. As amostras foram adquiridas em FACsorting (Becton and Dickson, San Jose, EUA) utilizando os canais de fluorescência 1 (FL1) para anexina V, 2 (FL-2 para PI). As análises foram feitas usando programas Cell Quest (Becton and Dickson, San Jose, EUA) e Flow Jo 5.7.2 (TreeStar Inc., Ashland, EUA) os quais permitem analisar todas as células adquiridas (10000/ amostra) ou apenas determinadas populações, individualizadas por janelas (ou *gates*) estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL).

13. Avaliação da perda óssea alveolar maxilar

Para avaliar a perda óssea induzida após a inoculação oral de *A. actinomycetemcomitans*, amostras das maxilas dos animais foram obtidas nos tempos experimentais estabelecidos. Após a retirada do tecido gengival palatino, as maxilas foram imersas em peróxido de hidrogênio a 10% por 7 dias para remoção dos demais debris orgânicos. As amostras foram, então, lavadas com água destilada, secas e imersas em uma solução de azul de metileno e água (2:1) para evidenciação da junção amelo-cementária.

Cada hemi-maxila foi posicionada sobre um papel milimetrado e com uma câmera fotográfica acoplada a um estereoscópio (MZ12**,** Leica, Mannhein, Alemanha) foram feitas imagens da face palatina (aumento de 25 vezes). Com o auxílio do programa ImageJ 1.36b (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) as imagens foram submetidas ao cálculo da área (mm^2) entre a junção amelo-cementária (JAC) e a crista óssea alveolar (COA).

14. Análise histopatológica

O tecido periodontal, ósseo e os molares superiores de animais foram coletados após indução da doença periodontal nos períodos experimentais estabelecidos. As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 10%, em temperatura ambiente, pelo tempo mínimo de 48 horas e descalcificadas em solução de EDTA a 10%, em temperatura ambiente, pelo período de 6 semanas, com trocas semanais desta solução descalcificadora.

Após este período, as peças foram lavadas com água destilada e submetidas à desidratação gradativa em álcool, seguida de xilol e processamento em parafina. Cortes seriados com espessura de 5 μm foram obtidos através de um micrótomo, montados em lâminas de vidro e corados com coloração em hematoxilina e eosina.

A análise histopatológica foi realizada através da observação de cortes seriados em microscopia ótica, com o objetivo de avaliar a presença e a localização de células inflamatórias nos tecidos periodontais, assim como as características histológicas do epitélio juncional, ligamento e osso alveolar periodontal. Animais não infectados foram usados como controles.

15. Análise de unidades formadoras de colônias após infecção por *A. actinomycetemcomitans*

A presença de UFC de *A. actinomycetemcomitans* foi avaliada em amostras de órgãos de animais após infecção peritoneal ou oral por esta bactéria. Os órgãos foram coletados, pesados e transferidos para criotubo contendo 1 mL de PBS estéril. Os órgãos foram homogeneizados de modo asséptico (UltraTurrax 8.0; IKA, Staufen, Alemanha) e uma alíquota de 25 µL (para amostras obtidas após infecção peritoneal) ou 100 µL (para amostras obtidas após infecção oral) foi semeada em placas de *Petri* (100 mm de diâmetro) contendo TSA + 0,6% de extrato de levedura por 7 dias, em microaerofilia. Após este período foi determinado o número de UFC de *A. actinomycetemcomitans* por grama de órgão coletado.

16. Análise estatística

Os resultados foram expressos pela média ± desvio padrão (SD) dos resultados obtidos para cada grupo. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prisma 4 (PRISMA software, GraphPad, San Diego, EUA). Valores de $p < 0.05$ foram considerados como significantes.

RESULTADOS

1. Susceptibilidade de animais TLR4$^{-/-}$ à infecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Com o intuito de determinar o papel do receptor TLR4 durante o desenvolvimento da doença periodontal, camundongos selvagens (WT) e deficientes de TLR4 (TLR4-/-) foram infectados por via oral com 1x10^{8} bacilos viáveis de *A. actinomycetemcomitans* por três dias. A sobrevida dos animais foi avaliada por 60 dias após a infecção. Os resultados mostram que 100% dos animais sobreviveram à infecção oral com *A. actinomycetemcomitans* (Figura 1). Esses resultados mostram que a ausência de TLR4 não está relacionada com um aumento da susceptibilidade dos animais à infecção por *A. actinomycetemcomitans.*

2. Ausência de TLR4 reduz perda óssea alveolar induzida por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Buscando investigar o papel de TLR4 na determinação da severidade da DP, o próximo passo foi analisar a perda óssea alveolar em resposta à inoculação oral de *A. actinomycetemcomitans* em animais WT e TLR4$^{-/-}$.

Os resultados revelaram que camundongos TLR4$^{-/-}$ submetidos ao protocolo de infecção com *A. actinomycetemcomitans* apresentaram menor reabsorção óssea alveolar, determinada pela análise da área compreendida entre a junção amelo-cementária (JAC) e a crista óssea alveloar (COA), nos tempos de 3 ($P<0,001$) e 7 dias ($P<0,01$) após-infecção quando comparado ao aos animais selvagens (Figura 2). Ao contrário, os animais TLR4$^{-/-}$ e WT não infectados não apresentaram perda óssea no período estudado (Figura 2).

3. Análise histológica de tecido gengival de animais submetidos à doença periodontal induzida por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A partir das amostras de tecido periodontal obtidas de animais WT e TLR4$^{-/-}$ infectados via oral por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans,* foram confeccionados cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina para a análise microscópica.

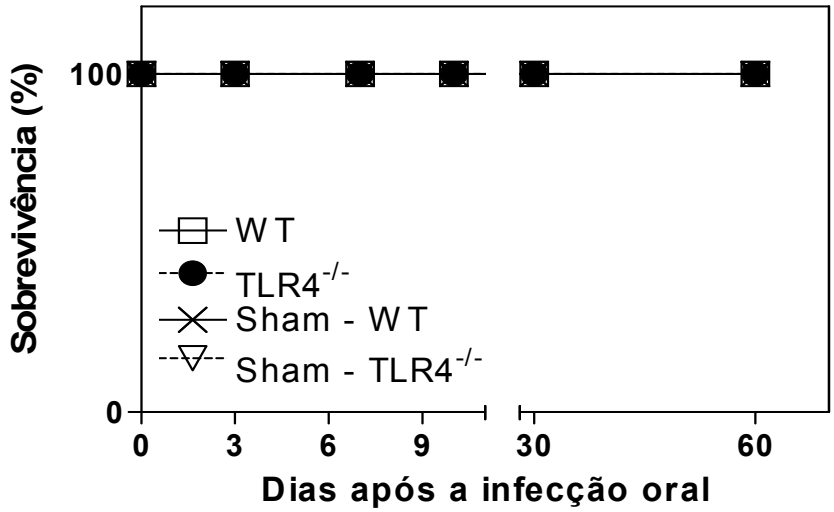


Figura 1. Sobrevida de animais WT e TLR4$^{-/-}$ após infecção oral com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans.* Animais WT e TLR4$^{-/-}$ foram submetidos à indução da doença periodontal através da infecção oral com *A. actinomycetemcomitans.* A sobrevida dos animais foi monitorada por 60 dias.

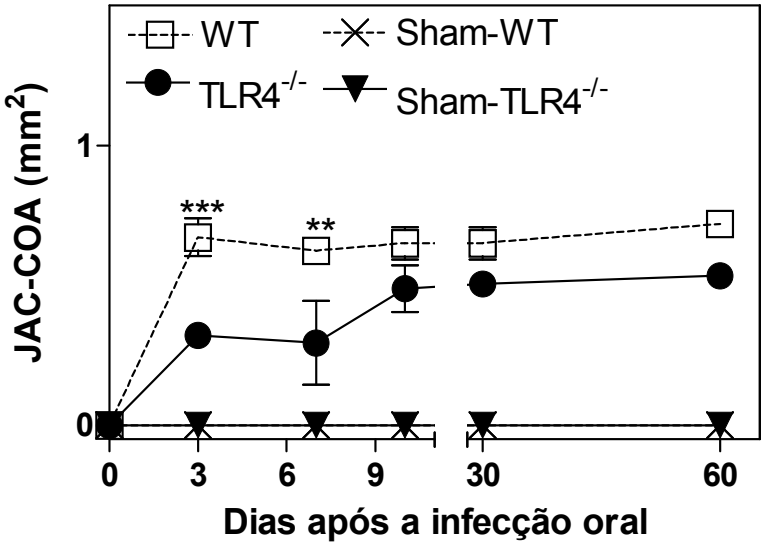


Figura 2. Ausência de TLR4 reduz perda óssea alveolar induzida por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans.* Animais WT e TLR4$^{-/-}$ foram submetidos à indução da doença periodontal através da infecção oral com *A. actinomycetemcomitans.* (**A)** A perda óssea alveolar foi mensurada através da área formada entre a junção amelo-cementária (JAC) e a crista óssea alveolar (COA). Os dados representam a média ± SD de três experimentos independentes com 3 animais por período avaliado. ** p<0,01, ***p<0,001, usando ANOVA para dois critérios e pós-teste de Bonferroni.

A análise histológica foi inicialmente realizada em amostras de tecidos periodontais de camundongos WT e TLR4$^{-/-}$ não infectados (Figura 3 A e B). Nestas amostras, identificou-se microscopicamente a presença de mucosa gengival revestida por epitélio pavimentoso estratificado, em continuidade com o epitélio sulcular que se continua como epitélio juncional. Subjacente observou-se tecido conjuntivo fibroso, composto por fibras colágenas, pequenos vasos e discreto infiltrado inflamatório composto, principalmente, por polimorfonucleares, muitas vezes no interior dos epitélios juncional e sulcular.

A análise histológica dos tecidos periodontais de camundongos WT infectados demonstrou que no período de 60 dias, observou-se um intenso infiltrado inflamatório, aumento da vascularização e intensa perda óssea (Figura 3 C). A análise histológica dos tecidos periodontais de camundongos TLR4$^{-/-}$ infectados demonstrou que, sessenta dias após a infecção, o tecido apresentava integridade do epitélio juncional, com a presença de discreto infiltrado inflamatório e moderada perda óssea (Figura 3 D).

4. Disseminação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* após infecção oral é maior em animais TLR4$^{-/-}$

A disseminação de bactérias causadoras da doença periodontal está comumente associada a outras infecções sistêmicas como endocardite, infecções renais e abscessos pulmonares (WINKELHOFF; SLOTS, 1999; VIALLARD *et al*., 2002; DYE *et al.*, 2005).

Assim, após a infecção por *A. actinomycetemcomitans* foram coletadas amostras de gengiva, linfonodo, baço, coração, pulmão, fígado e rim de animais WT e TLR4$^{-/-}$ para a detecção de *A. actinomycetemcomitans.*

A presença de *A. actinomycetemcomitans* foi detectada no tecido gengival e em amostras de linfonodos, baço, pulmão, fígado, e rim de animais TLR4$^{-/-}$ e nos animais selvagens a presença desta bactéria foi detectada apenas no coração (Figura 4).

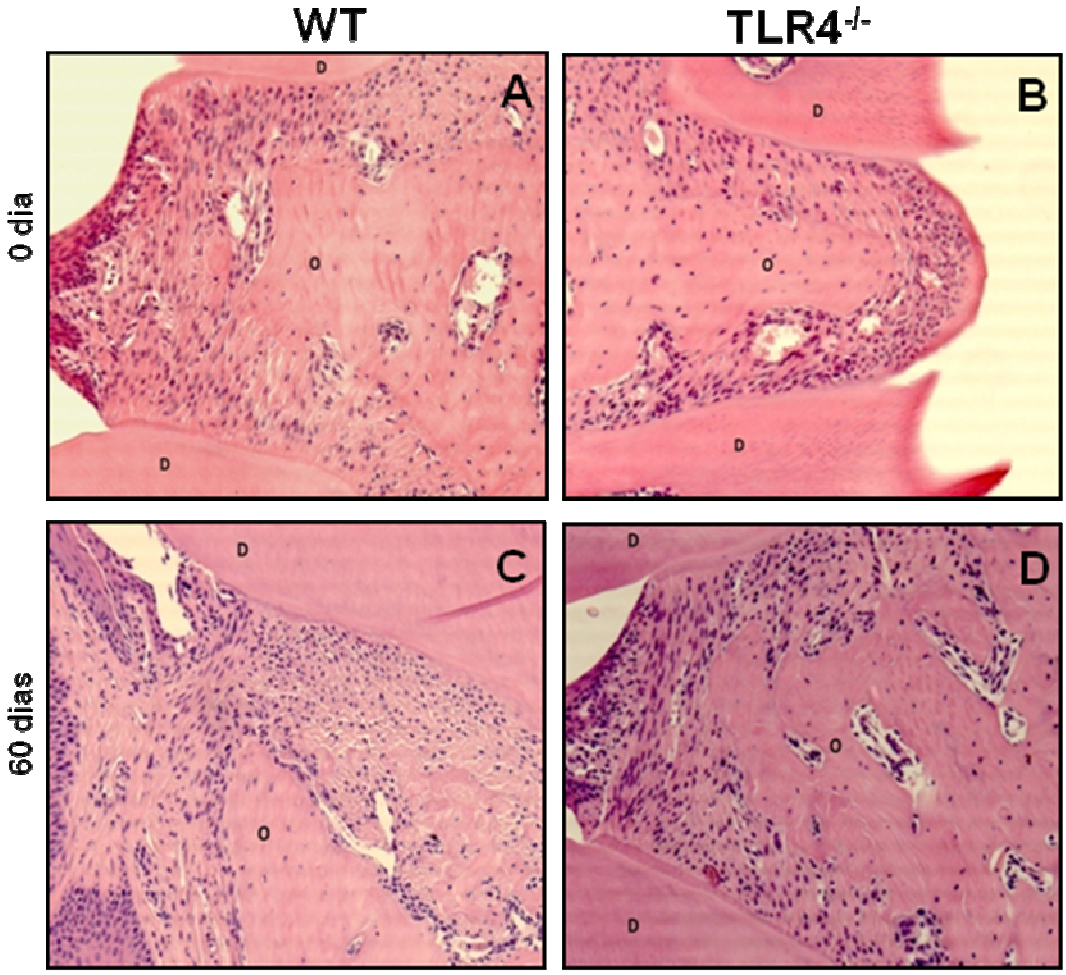


Figura 3. Análise histológica dos tecidos periodontais após infecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans.* Animais WT e TLR4$^{-/-}$ foram submetidos à indução da doença periodontal através da infecção oral com *A. actinomycetemcomitans.* Amostras do tecido periodontal de animais não infectados **(A, B)** e após 60 dias de infecção **(C, D)** foram coletadas, fixadas e submetidas ao processamento histológico. Cortes de 5 µm de espessura foram obtidos, corados com hematoxilina e eosina e analisados em microscópio óptico em aumento de 200X. Os dados representam três experimentos independentes com 3 animais por período avaliado. **D**: Dente, **O**: Osso alveolar.

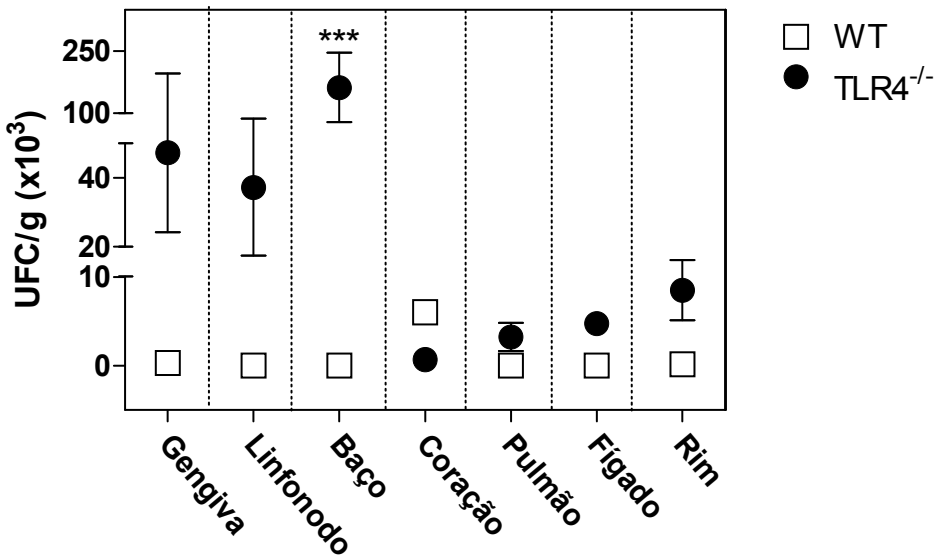


Figura 4. Disseminação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* após indução da doença periodontal. Animais WT e TLR4$^{-/-}$ foram submetidos à indução da doença periodontal através da infecção oral com *A. actinomycetemcomitans.* Após 60 dias de infecção foram coletadas amostras de gengiva, linfonodo, baço, coração, pulmão, fígado e rim e avaliada a presença de UFC de *A. actinomycetemcomitans*. Os dados expressam a média ± SD e representam três experimentos independentes com 6 animais por grupo. ***p<0,001 usando ANOVA para dois critérios e pós-teste de Bonferroni.

5. Atividade de mieloperoxidase é afetada pela ausência de TLR4 após infecção oral por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Uma vez que a mieloperoxidase é um dos marcadores da ativação de neutrófilos e o aumento em sua atividade pode ser relacionado, por exemplo, a uma resposta contra um foco infeccioso secundário (GEBSKA *et al*., 2005) a atividade desta enzima foi avaliada após a infecção oral com *A. actinomycetemcomitans*

Os níveis da atividade de MPO no linfonodo, baço, pulmão, fígado e rim foram semelhantes entre os animais WT e TLR4$^{-/-}$ após 60 dias de indução da doença periodontal. Entretanto, os tecidos gengival e cardíaco de animais WT apresentaram a atividade desta enzima significativamente aumentada ($p<0.001$)(Figura 5).

6. Ausência de TLR4 não influencia a migração de células inflamatórias para o foco de infecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

O receptor TLR4 está envolvido no reconhecimento de bactérias gram-negativas e pode modular a quimiotaxia de células inflamatórias para o local da infecção (FAN; MALIK, 2003; AKIRA; TAKEDA, 2004). Para avaliar a influência de TLR4 na migração de células para o sítio de infecção, animais WT e TLR4$^{-/-}$ foram inoculados por via intraperitoneal com *A. actinomycetemcomitans*. Após 24 horas de infecção, o peritônio foi lavado e as células inflamatórias foram coletadas e contadas em câmara de Neubauer. Os resultados demonstraram que a ausência de TLR4 não alterou de modo significante o número de células recrutadas para o foco da infecção em animais deficientes de TLR4 (12,06 ± 5,01 x10^{6}) quando comparados aos animais selvagens (12,31 ± 3,76 x10^{6}) (Figura 6A). No peritônio dos animais inoculados apenas com PBS, observou-se um baixo recrutamento de leucócitos (Figura 6A). A contagem celular diferencial revelou recrutamento preferencial de neutrófilos para cavidade peritoneal de animais selvagens e deficientes de TLR4 após a infecção por *A. actinomycetemcomitans*. Além disto, o influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais TLR4$^{-/-}$ (10,31 ± 2,57 x10^{6}) foi semelhante ao de animais WT

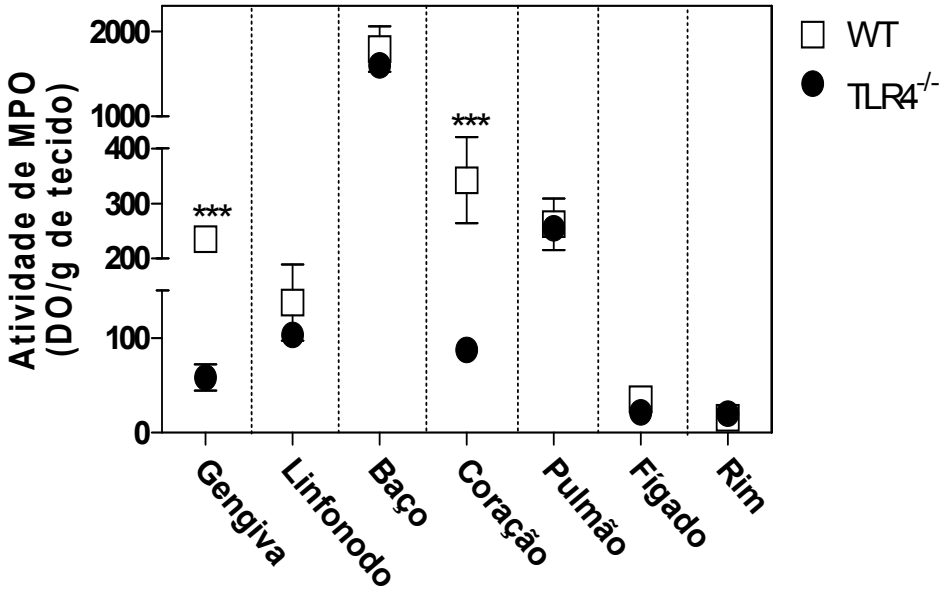


Figura 5. Atividade de mieloperoxidase (MPO) após indução da doença periodontal com *A. actinomycetemcomitans*. Animais WT e TLR4$^{-/-}$ foram submetidos à indução da doença periodontal através da infecção oral com *A. actinomycetemcomitans.* A atividade de MPO foi mensurada em amostras de gengiva, linfonodo, baço, coração, pulmão, fígado e rim após 60 dias de infecção. Os dados expressam a média ± SD e representam três experimentos independentes com 6 animais por grupo. ***p<0,001 usando ANOVA para dois critérios e pós-teste de Bonferroni.

(11,25 ± 4,69 x10^6) após a inoculação de *A. actinomycetemcomitans* (Figura 6B).

Em relação ao número de macrófagos, isolou-se do peritônio de animais WT e TLR4$^{-/-}$ um baixo número destas células quando comparado ao número de neutrófilos. Observou-se um leve aumento no número de macrófagos recuperados de animais TLR4$^{-/-}$ (1,75 ± 1,19 x10^6) inoculados com *A. actinomycetemcomitans* quando comparado ao dos animais selvagens (0,93 ± 1,04 x10^6) (Figura 6C).

7. A fagocitose de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por neutrófilos e macrófagos é menor na ausência de TLR4

O reconhecimento de estruturas antigênicas através de TLR4 pode ativar mecanismos efetores das células fagocíticas (NATHAN *et al*., 2003; DALE; BOXER; LILES, 2008). Para a avaliação da atividade fagocítica, as células recém isoladas da cavidade peritoneal de animais TLR4$^{-/-}$ e selvagens infectados com *A. actinomycetemcomitans* foram coradas por *May-Gruwald* e *Giemsa* e a percentagem de fagocitose foi determinada. Na análise dos dados, observou-se que os macrófagos e neutrófilos de animais TLR4$^{-/-}$ apresentaram uma menor atividade fagocítica quando comparado às células de animais selvagens (Figura 7A).

Neutrófilos e macrófagos de animais deficientes de TLR4 e selvagens foram cultivados *in vitro* com *A. actinomycetemcomitans* e a atividade fagocítica foi avaliada por citometria de fluxo. Os ensaios *in vitro* confirmaram os dados obtidos *in vivo* no qual se observou que neutrófilos (57 ± 5,86%) e macrófagos (88,63 ± 10,07%) de animais selvagens apresentaram uma maior atividade fagocítica quando comparados aos neutrófilos (43,86 ± 4,33%) e macrófagos (54,73 ± 12,84%) de animais deficientes de TLR4 (Figura 7B). Além disto, imagens obtidas através de microscopia confocal corroboram com esses resultados, já que as células obtidas de animais deficientes de TLR4 (Figura 7D) apresentam reduzida habilidade de fagocitar *A. actinomycetemcomitans* quando comparado às células de animais selvagens (Figura 7C).

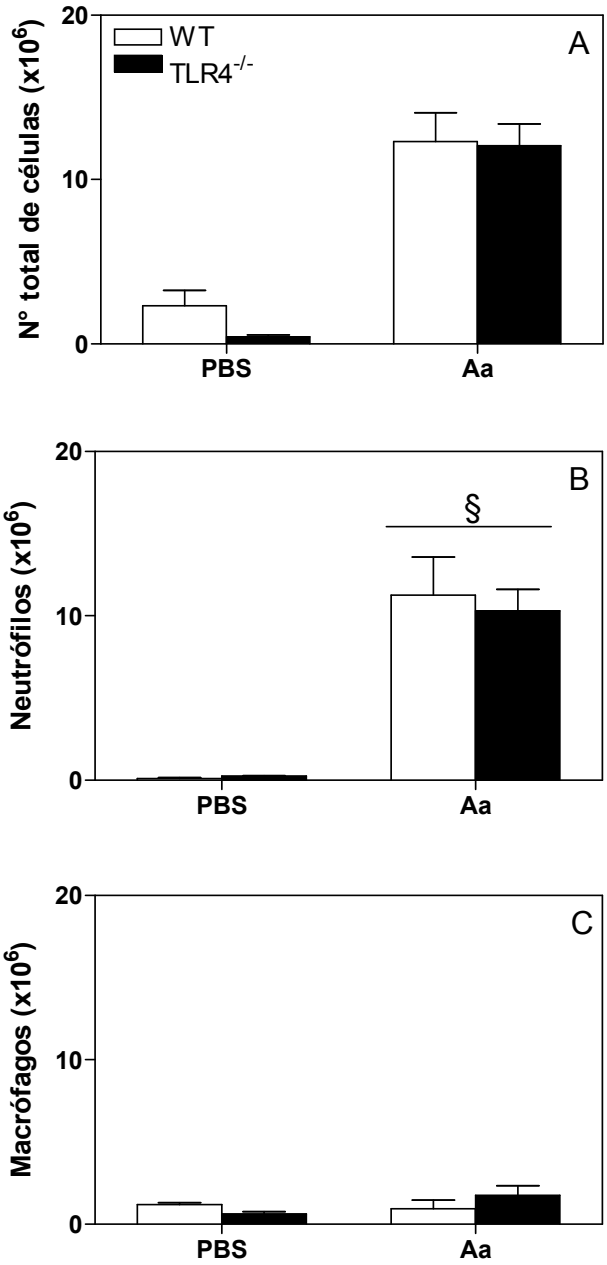


Figura 6. Influxo de leucócitos para a cavidade peritoneal de animais WT e TLR4$^{-/-}$ após inoculação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Animais WT e TLR4$^{-/-}$ foram inoculados com *A. actinomycetemcomitans* por via intraperitoneal e após 24h o infiltrado inflamatório foi recuperado. A caracterização e contagem **(A)** do número total de células presentes no exsudado inflamatório foram realizadas em câmara de Neubauer. O número de **(B)** neutrófilos e **(C)** macrófagos foi mensurado através de contagem celular diferencial. Os dados representam a média ± SD de três experimentos independentes com 6 animais por grupo. §$p<0,05$ para os grupos WT e TLR4$^{-/-}$ inoculados com *A. actinomycetemcomitans* em relação aos controles com PBS usando ANOVA para um critério e pós-teste de Tukey.

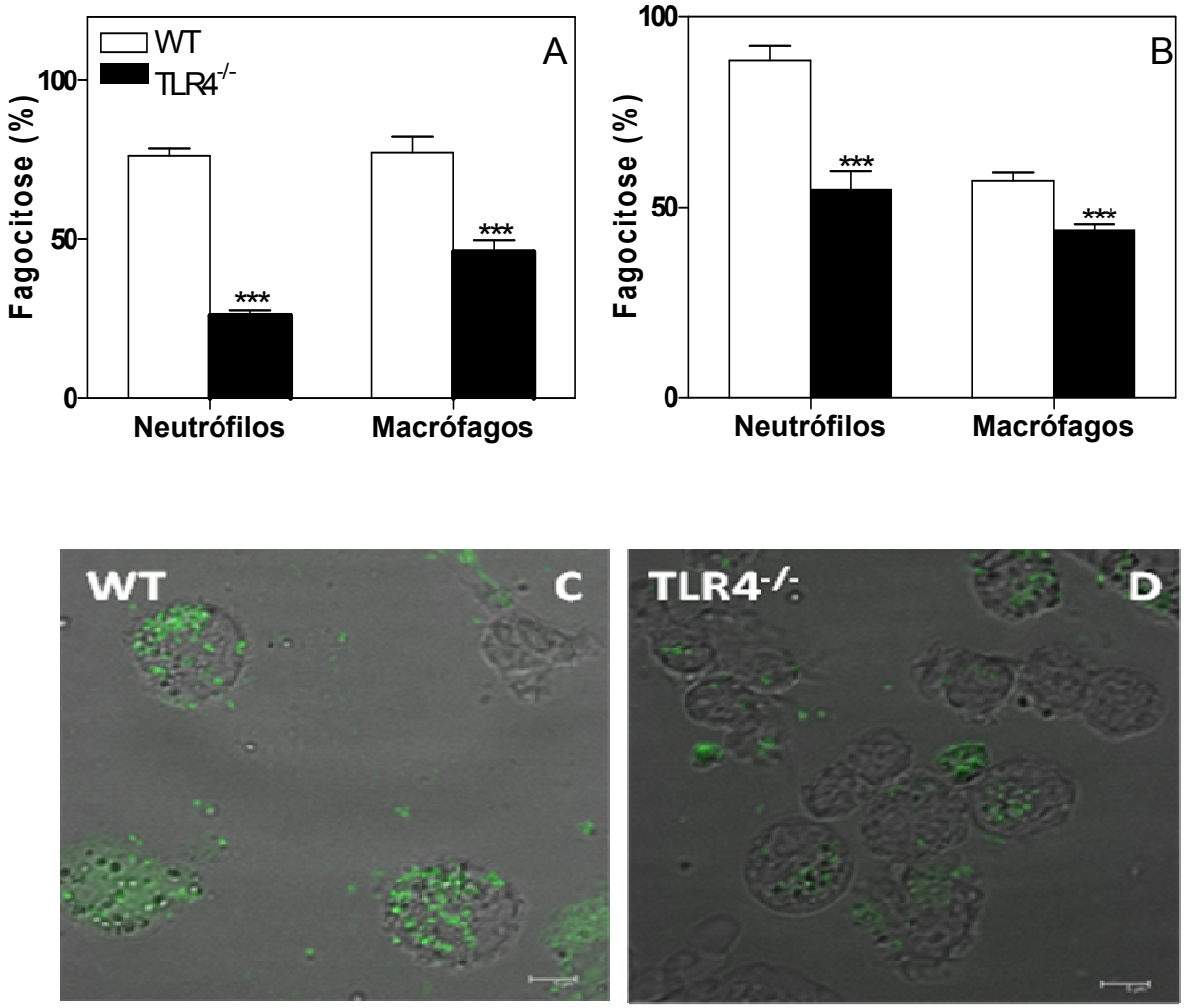


Figura 7. A fagocitose de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* é menos eficiente na ausência de TLR4. Animais WT e TLR4$^{-/-}$ foram inoculados por via intraperitoneal com *A. actinomycetemcomitans.* Após 24h o infiltrado inflamatório foi recuperado e corado com *May-Grunwald e Giemsa*. **(A)** Contagem dos neutrófilos e macrófagos em fagocitose realizada por microscopia óptica. **(B)** Animais WT e TLR4$^{-/-}$ foram inoculados por via intraperitoneal com tioglicolato e obtidos neutrófilos e macrófagos. As células foram cultivadas por 1h com *A. actinomycetemcomitans* previamente marcado com FITC (1:10) e a atividade fagocítica foi avaliada por citometria de fluxo. **(C, D)** Fotomicrografia evidenciando o ensaio de fagocitose *in vitro* na presença de *A. actinomycetemcomitans* marcado com FITC na proporção de (1:10). **C**, células de animais controle e em **D**, células de animais TLR4$^{-/-}$. Os resultados foram expressos pela média ± SD e são representativos de três experimentos com 6 animais em cada grupo. ***p<0,001 para teste *t* de Student.

8. Produção de espécies reativas de nitrogênio após desafio por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* não é influenciada por TLR4

Estudos demonstram que a produção de espécies reativas de oxigênio está envolvida na eliminação de periodontopatógenos, estando estes mediadores envolvidos com o controle da infecção periodontal (BOGDAN, 2002; JO *et al.*, 2006; SOSROSENO, WIHASKORO; HERMINAJENG, 2002; SOSROSENO *et al.*, 2008). Nesse sentido, inicialmente avaliou-se os níveis de óxido nítrico no peritôneo de animais infectados por *A. actinomycetemcomitans*. Os resultados revelaram que a infecção não induziu um aumento significativo na produção de óxido nítrico pelas células de animais TLR4$^{-/-}$ e WT quando comparado com o grupo controle inoculado apenas com PBS (Figura 8A).

Para avaliar *in vitro* o perfil de produção de NO por neutrófilos e macrófagos provenientes de animais selvagens e deficientes de TLR4, as células foram cultivadas por 24h na presença de *A. actinomycetemcomitans*, antígenos sonicados de *A. actinomycetemcomitans* ou LPS e a concentração de NO no sobrenadante das culturas foi avaliada pelo método de Griess. A estimulação com antígenos de *A. actinomycetemcomitans* e com a bactéria não induziu produção significante de NO por neutrófilos de animais TLR4$^{-/-}$ ($p<0,001$), contudo, esses estímulos foram capazes de induzir a produção de NO por neutrófilos de animais selvagens (Figura 8B). A produção de NO por macrófagos deficientes de TLR4 e selvagens foi semelhante após estimulação com *A. actinomycetemcomitans.* No entanto, a estimulação com antígenos de *A. actinomycetemcomitans* gerou maior produção de NO por células de animais TLR4$^{-/-}$ (Figura 8C).

9. A ausência de TLR4 não influencia a atividade de mieloperoxidase após desafio por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima que apresenta importante atividade microbicida em infecções bacterianas (MIYASAKI; WILSON; GENCO, 1986; MIYASAKI *et al.*, 1987) e é considerada um marcador da atividade de neutrófilos ativados (KLEBANOFF, 2005). Para avaliar a influência de receptores do tipo Toll 4 na ativação de neutrófilos após

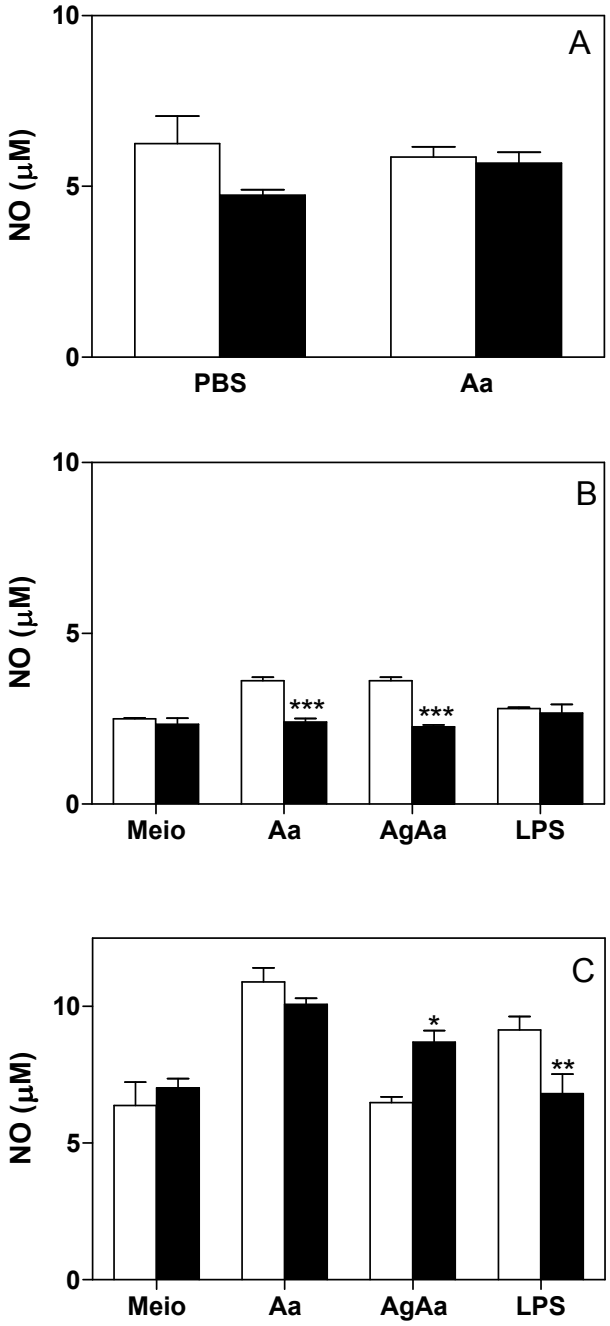


Figura 8. Produção de NO por neutrófilos e macrófagos após desafio por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans.* (A) Animais WT e TLR4$^{-/-}$ foram inoculados por via intraperitoneal com *A. actinomycetemcomitans* por 24h. O infiltrado inflamatório foi recuperado e a suspensão celular foi centrifugada e do sobrenadante obtido foi mensurada a produção de óxido nítrico pela reação de Griess. Animais WT e TLR4$^{-/-}$ foram inoculados por via intraperitoneal com tioglicolato e isolados **(B)** Neutrófilos e **(C)** macrófagos. As células coletadas foram estimuladas por 24h com *A. actinomycetemcomitans,* antígenos de *A. actinomycetemcomitans* ou LPS de *E. coli* e a partir do sobrenadante das culturas foi mensurada a produção de óxido nítrico. Os resultados foram expressos pela média ± SD e são representativos de três experimentos com 6 animais por grupo. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 para teste *t* de Student.

infecção por *A. actinomycetemcomitans*, analisou-se a atividade de MPO em células recém isoladas da cavidade peritoneal de animais TLR4$^{-/-}$ e WT.

Os resultados revelam que não há diferenças na atividade da enzima entre as células do exsudado de animais WT e TLR4$^{-/-}$ (Figura 9A). Em adição, na ausência de estímulo (grupo inoculado com PBS) a atividade de mieloperoxidase foi baixa por células de animais WT e TLR4$^{-/-}$, quando comparada com as células de animais infectados ($p<0,01$).

Em seguida, avaliou-se a capacidade de *A. actinomycetemcomitans*, antígenos sonicados de *A. actinomycetemcomitans* e LPS de *E. coli* em estimular neutrófilos de animais WT e TLR4$^{-/-}$ a expressarem mieloperoxidase. Como se pode observar na figura 9B, os estímulos utilizados não induziram significativamente a atividade de MPO tanto por células de animais WT quanto TLR4$^{-/-}$.

10. TLR4 não confere aumento na viabilidade de neutrófilos e macrófagos após infecção por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A presença de células apoptóticas foi avaliada em células recém isoladas da cavidade peritoneal de animais WT e TLR4$^{-/-}$ após infecção por *A. actinomycemtemcomitans.*

Os resultados mostram maior número de células apoptóticas isoladas da cavidade peritoneal de animais deficientes de TLR4 (33,5 ± 4,95%) e de animais WT (36 ± 4,95%) após a infecção por *A. actinomycemtemcomitans* quando comparados aos animais controle inoculados com PBS (Figura 10A).

Em seguida, avaliou-se a capacidade de *A. actinomycetemcomitans*, antígenos sonicados de *A. actinomycetemcomitans* e LPS de *E. coli* em induzir apoptose em neutrófilos e macrófagos isolados de animais WT e TLR4$^{-/-}$. Os resultados revelam que *A. actinomycetemcomitans* induziu apoptose de modo significativo em neutrófilos de animais TLR4$^{-/-}$ (31,5 ± 0,7%) quando comparado ao grupo controle (11 ± 1,41%), mas não foram observadas diferenças na indução de apoptose pelos demais estímulos (Figura 10B).

O nível de apoptose em macrófagos de animais WT e TLR4$^{-/-}$ foi semelhante, mesmo quando estimulados por *A. actinomycemtemcomitans* ou seus antígenos (Figura 10C).

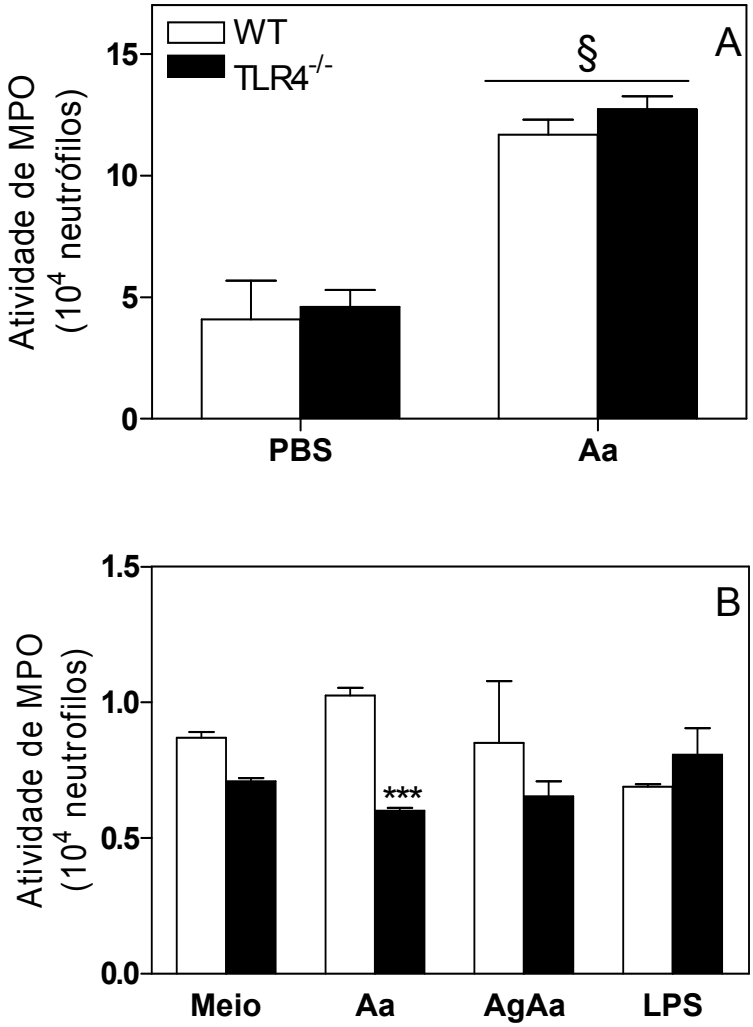


Figura 9. Atividade de mieloperoxidase (MPO) após desafio por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans.* Animais WT e TLR4$^{-/-}$ foram inoculados por via intraperitoneal com *A. actinomycetemcomitans* por 24h. **(A)** A atividade de MPO foi analisada a partir das células presentes no infiltrado inflamatório peritoneal. **(B)** Neutrófilos obtidos de animais WT e TLR4$^{-/-}$ após inoculação intraperitoneal de tioglicolato foram estimulados por 24h com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans,* antígenos de *A. actinomycetemcomitans* ou LPS de *E. coli* e a partir dessas células foi avaliada a atividade de MPO. Os resultados foram expressos pela média ± SD e são representativos de três experimentos independentes com 6 animais por grupo. ***p<0,001 para teste *t* de Student. §p<0,01 para animais WT e TLR4$^{-/-}$ inoculados com *A. actinomycetemcomitans* em relação ao PBS usando ANOVA para um critérios e pós-teste de Tukey.

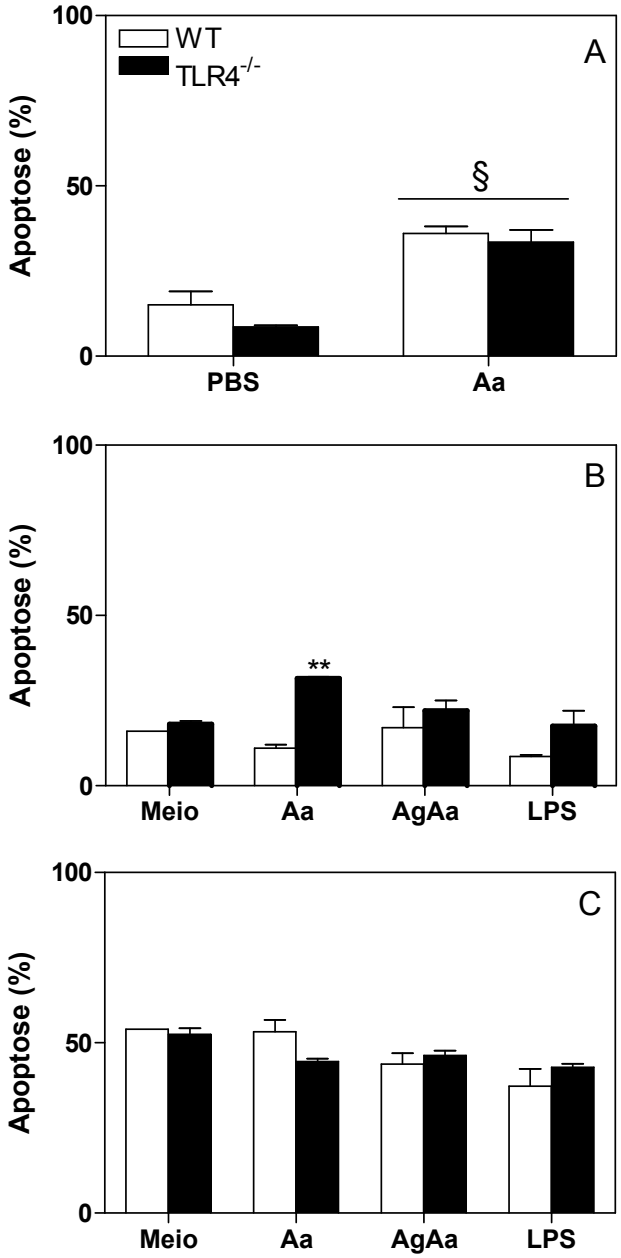


Figura 10. **Apoptose induzida por *Aggregatibacter actinomycemtemcomitans* em neutrófilos e macrófagos**. Animais WT e TLR4$^{-/-}$ foram inoculados por via intraperitoneal com *A. actinomycetemcomitans* por 24h. A análise das células apoptóticas foi realizada através da marcação com anexina e/ou iodeto, por citometria de fluxo. **(A)** Presença de células apoptóticas no infiltrado inflamatório peritoneal. Animais WT e TLR4$^{-/-}$ foram inoculados por via intraperitoneal com tioglicolato. A apoptose induzida em **(B)** neutrófilos e **(C)** macrófagos após 24h de estimulação com *A. actinomycetemcomitans,* antígenos de *A. actinomycetemcomitans* ou LPS de *E. coli* foi mensurada. Os resultados foram expressos pela média ± SD e são representativos de três experimentos independentes com 6 animais por grupo. **p<0,01 para teste *t* de Student. §p<0,01 para animais WT e TLR4$^{-/-}$ inoculados com *A. actinomycetemcomitans* em relação ao PBS.

DISCUSSÃO

A doença periodontal caracteriza-se pela destruição das estruturas de suporte dos dentes causada pela presença de microorganismos periodontopatogênicos no biofilme dental associado aos tecidos periodontais. Apesar desses microorganismos serem essenciais para o início da doença periodontal a ativação da resposta imune do hospedeiro é a responsável pela manutenção do processo inflamatório e, conseqüente, ruptura da homeostase do tecido, o que caracteriza a doença (GEMMELL; SEYMOUR, 2004; GARLET *et al.,* 2007). Este processo inflamatório é deflagrado pelas células do hospedeiro através do reconhecimento das estruturas antigênicas dos microorganismos, mediada principalmente por receptores do tipo Toll (AKIRA; TAKEDA, 2004; MADIANOS; BOBETSIS; KINANE, 2005). Dentre essa classe de receptores, o TLR4 sinaliza a presença de lipopolissacarídeo expresso por bactérias gram-negativas (AKIRA; TAKEDA, 2004) e o papel deste receptor na progressão da doença periodontal tem sido alvo de recentes estudos (NAKAMURA *et al*. 2008; SUN *et al*., 2008). No entanto, alguns aspectos da ativação das células inflamatórias por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* via TLR4 necessitam ser compreendidos.

Com o objetivo de investigar o papel de TLR4 na imunomodulação da doença periodontal induzida experimentalmente, analisamos o desenvolvimento da DP em camundongos TLR4$^{-/-}$. Após a indução da doença periodontal, os animais deficientes de TLR4 apresentaram menor perda óssea em relação aos animais selvagens. A maior reabsorção óssea observada nos animais WT pode ter sido causada pela ativação das células do sistema imune inato através de TLR4 e conseqüente modulação dos mecanismos envolvidos na diferenciação de osteoclastos. Os resultados aqui apresentados foram semelhantes aos obtidos por NAKAMURA *et al*. (2008) após análise histomorfométrica de maxilas de animais WT e TLR4$^{-/-}$ induzida por LPS de *A. actinomycetemcomitans.* Além disto, o lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas causadoras da doença periodontal (*P. intermédia e A. actinomycetemcomitans*) foi capaz de induzir a diferenciação de células da medula óssea em osteoclastos em animais selvagens e esta indução foi significativamente menor em animais TLR4$^{-/-}$ (ITO *et al*., 1996). Tendo em vista as diferenças observadas entre os animais TLR4$^{-/-}$ e WT quanto à perda óssea, foi realizada análise histológica dos tecidos periodontais. Os resultados revelaram um infiltrado inflamatório discreto nos animais TLR4$^{-/-}$ e maior presença de leucócitos polimorfonucleares em animais WT, o que poderia influenciar os resultados obtidos pela mensuração da perda óssea alveolar.

Após o terceiro dia de indução da doença periodontal, houve uma manutenção dos níveis de perda óssea em animais WT. Contudo, GARLET (2004), usando o mesmo modelo experimental, observou níveis crescentes de perda óssea em animais C57BL/6. Esses resultados, ainda que possam ser explicados pela diferença entre as linhagens de animais utilizadas (C57BL/6 e C3H/HePas), sugerem a possibilidade de haver distinta modulação dos mecanismos reguladores da diferenciação de osteoclastos, os quais são controlados pela atividade de células T (GARLET *et al*., 2007; YOUNES *et al*., 2008) através do aumento da produção de RANKL (BOSTANCI *et al.*, 2007; BOSTANCI *et al*., 2007; NAKAMURA *et al*., 2008). Uma vez que LPS pode ativar células T com fenótipo regulatório (T_{reg}) através de TLR4 por elas expresso (CARAMALHO *et al*., 2003), a proliferação das demais populações de linfócitos pode ser alterada e, conseqüentemente, a diferenciação de osteoclastos. De fato, em lesões periodontais crônicas é possível isolar T_{reg} (CARDOSO *et al*., 2008) e estas células podem, ainda, controlar negativamente a atividade de neutrófilos através da redução da produção de espécies reativas de oxigênio, de citocinas pró-inflamatórias e da indução da apoptose dessas células (LEWKOWICZ *et al*., 2006), o que pode induzir quadros crônicos da doença.

Embora os animais $TLR4^{-/-}$ não tenham apresentado aumentados níveis de perda óssea nem infiltrado inflamatório pronunciado, a carga bacteriana de *A. actinomycetemcomitans* nos tecidos gengivais desses animais foi consideravelmente maior que nos animais selvagens. Além disto, a atividade de mieloperoxidase neste tecido foi significativamente menor nos animais deficientes de TLR4 quando comparados aos animais selvagens. A expressão de mieloperoxidase foi comumente detectada em abundância no fluido crevicular e saliva de indivíduos com doença periodontal (BUCHMANN *et al*., 2002; KANER *et al*., 2006; BORGES-JR *et al*., 2007; SAKAMOTO *et al*., 2008) sendo considerado um marcador de severidade desta doença e a atividade desta enzima esteve diretamente relacionada à redução da viabilidade de *A. actinomycetemcomitans* (MIYASAKI; WILSON; GENCO, 1986; MIYASAKI *et al*., 1987).

Adicionalmente, foi possível detectar a presença de *A. actinomycetemcomitans* nos órgãos linfóides secundários e no pulmão, fígado e rim de animais deficientes de TLR4. A disseminação sistêmica de *A. actinomycetemcomitans* também foi observada, após infecção oral por esta bactéria, na ausência de produção de IFN-γ (GARLET *et al*., 2008) e IL-12 (GARLET, 2004), o que revela a importância do sistema inume no controle de uma infecção

por este periodontopatógeno. De fato, a ativação do sistema imune é crucial para o controle de uma infecção a qual se caracteriza pela migração de células inflamatórias e produção de mediadores inflamatórios no sítio da infecção (FANG *et al*., 2004). Os neutrófilos apresentam capacidade de migrar para foco infeccioso e a atividade de mieloperoxidase (MPO) destas células, em sítios distantes do foco primário de infecção, pode ser considerada um marcador da disseminação de um agente infeccioso (GEBSBA *et al*., 2005). A relação direta entre a presença de microorganismo e atividade de MPO pôde ser observada no tecido cardíaco de animais WT. No entanto, a detecção de *A. actinomycetemcomitans* nos órgãos linfóides e também no pulmão, fígado e rim de animais deficientes de TLR4 não foi capaz de desencadear uma efetiva ativação de neutrófilo, de acordo com os dados obtidos para a atividade de MPO, embora estes órgãos tenham considerável vascularização que permite a migração de células inflamatórias através da corrente sanguinea (GEBSKA *et al.*, 2005; KOBBE *et al*., 2008). Apesar da presença de *A. actinomycetemcomitans* estar comumente associada a outras infecções sistêmicas como endocardite, doença coronária aguda, infecções renais e abscessos pulmonares e cerebrais (DAVÉ; DYKE, 2008; OKSAHARJU *et al*. 2008; SAKURAI *et al*., 2007) a disseminação destas bactérias não afetou a sua sobrevida de animais TLR4$^{-/-}$.

Quando observados em conjunto, a ausência da sinalização via TLR4, embora se apresente vantajosa para a manutenção das estruturas periodontais após indução da doença periodontal, predispõe os animais deficientes de TLR4 à disseminação sistêmica de *A. actinomycetemcomitans*. A presença de um infiltrado inflamatório discreto e a maior detecção deste periodontopatógeno nos tecidos periodontais de animais TLR4$^{-/-}$ indicaram a possibilidade de alterações na quimiotaxia das células inflamatórias para este tecido e na modulação da atividade fagocítica dessas células.

Após contato com agente agressor, a população celular residente, especialmente macrófagos, células epiteliais e fibroblastos, reconhece o estímulo antigênico através de seus receptores e produzem citocinas, como CXCL8, CCL2, CCL5, que medeiam a quimiotaxia de células inflamatórias (MOSSER; EDWARDS, 2008), sendo que os neutrófilos são as primeiras células a serem quimioatraídas para o foco infeccioso (NATHAN, 2006). A produção dessas quimiocinas é positivamente regulada após a ativação celular via TLR,

portanto estes receptores participariam indiretamente na quimiotaxia de células inflamatórias (TRINCHIERI; SHER, 2007).

Para uma melhor compreensão desses eventos, o reconhecimento de *A. actinomycetemcomitans* por macrófagos residentes na cavidade peritoneal e a modulação do recrutamento de neutrófilos para o foco infeccioso foram avaliadas por meio da observação do número de células obtidas do infiltrado celular. Os resultados obtidos revelaram que TLR4 não foi primordial para o reconhecimento de *A. actinomycetemcomitans*, uma vez que o número de neutrófilos recuperados de animais WT e TLR4$^{-/-}$ foi semelhante. CHEN *et al.* (2004) também não observaram diferença no número de neutrófilos recuperados de animais WT ou deficientes de TLR4 após infecção pulmonar de *F. tularensis*, bactéria gram-negativa. No entanto, não foi detectada a presença substancial de neutrófilos no lavado pulmonar de animais deficientes em TLR4 após a inoculação LPS de *E. coli* nas vias respiratórias (BURCH *et al*., 2006) nem no infiltrado inflamatório peritoneal recuperados após inoculação de *C. albicans* (NETEA *et al.*, 2002).

Nossos resultados mostraram distintos padrões para a presença de neutrófilos após a infecção peritoneal e oral por *A. actinomycetemcomitans* em animais TR4$^{-/-}$ o que nos permite inferir que TLR4 foi pouco relevante no reconhecimento deste microorganismo por macrófagos nos estágios iniciais da infecção, mas não nos estágios mais avançados. No início da infecção, o reconhecimento de outras estruturas antigênicas da bactéria através dos demais receptores expressos pelos macrófagos, como TLR2 e TLR5, *fmlp*R, FcγR e C3R (AKIRA; TAKEDA, 2004; AZUMA, 2006; MADIANOS; BOBETSIS; KINANE, 2005) tornariam a sinalização via TLR4 menos relevante. Embora a presença de *A. actinomycetemcomitans* não tenha sido detectada nos tecidos periodontais de animais selvagens observou-se a manutenção de um microambiente inflamatório evidenciado pelo infiltrado inflamatório nestes tecidos. A presença de *A. actinomycetemcomitans* no periodonto de animais selvagens em níveis não detectados pela análise do número de colônias formadas em placas de cultura poderia justificar a migração de células inflamatórias mesmo após 60 dias da infecção oral, uma vez que a ativação de neutrófilos por LPS através de TLR4 se relacionou à redução da expressão de receptores envolvidos na permanência dessas células nos vasos sanguíneos e permitiu que houvesse aumento da migração de neutrófilos para os focos de infecção (FAN; MALIK, 2003).

Uma vez presentes no local da infecção, os neutrófilos e macrófagos participam da eliminação dos microrganismos através de sua capacidade de fagocítica (DALE; BOXER; LILES, 2008; STUART; EZEKOWITZ, 2008). A permanência de microrganismos nos tecidos periodontais favorece a progressão da doença periodontal e está associada a uma menor capacidade das células fagocitárias em eliminá-los (EICK *et al*., 2000; JI *et al*., 2007; PERMPANICH; KOWOLIK; GALLI, 2006).

De acordo com os resultados apresentados, a capacidade de neutrófilos e macrófagos em fagocitar *A. actinomycetemcomitans*, *in vivo* e *in vitro,* foi significativamente menor nos animais TLR4$^{-/-}$ quando comparada aos animais selvagens. Células fagocitárias, na ausência de TLR4, também apresentaram menor capacidade de fagocitar *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Yersenia pestis* (JAIN *et al*., 2008), eritrócitros de carneiro opsonizados com IgG (ANAND *et al.*, 2007), *Salmonella enterica* (VAZQUEZ-TORRES *et al*., 2004) e *C. albicans* (NETEA *et al.*, 2002).

Além disto, as diferenças entre as médias das fagocitoses das células inflamatórias analisadas, na presença ou ausência de TLR4, sugerem que este receptor poderia exercer maior influência na atividade fagocítica de neutrófilos que de macrófagos. Este fato relacionar-se-ia a uma possível expressão diferencial dos receptores de reconhecimento das estruturas antigênicas dos microorganismos entre essas células, e também a distintos padrões de sinalização intracelular necessários à fagocitose, como a endocitose e formação do fagossomo nestas células (STUART; EZEKOWITZ, 2008). A reduzida efetividade na eliminação de *A. actinomycetemcomitans* por células deficientes de TLR4 e os mecanismos de evasão desta bactéria elucidam a maior disseminação desta bactéria para os órgãos dos animais TLR4$^{-/-}$ (WINKELHOFF; SLOTS, 1999; HENDERSON *et al*., 2002; BURNS *et al*., 2006; PERMPANICH; KOWOLIK; GALLI, 2006).

Estudos revelam ainda que há uma relação entre a capacidade de eliminação de um microrganismo e a produção de espécies reativas de oxigênio (KATSURAGI *et al*., 2003; NATHAN, 2006). Contudo, embora a fagocitose tenha sido prejudicada pela ausência de TLR4, a produção de óxido nítrico e atividade de mieloperoxidase pelas células do infiltrado inflamatório detectada na cavidade peritoneal não foram diferentes entre animais WT e TLR4$^{-/-}$ após infecção com *A. actinomycetemcomitans*. Uma vez que este infiltrado inflamatório era formado por neutrófilos e macrófagos, células com distintas funções

celulares no processo inflamatório (MOSSER; EDWARDS, 2008; NATHAN, 2006), a influência de TLR4 na ativação dessas células e o perfil de produção dos mediadores microbicidas foram avaliados *in vitro*. Dessa forma, TLR4 mostrou-se importante para a ativação de neutrófilos, mas não para a ativação de macrófagos, frente à estimulação com *A. actinomycetemcomitans*, sendo que antígenos sonicados desta bactéria induziram macrófagos deficientes de TLR4 a produzirem significativamente mais NO que células de animais selvagens. Contrariamente, TLR4 influenciou a produção de NO pelas células de Kupffer, já que a expressão de iNOS, frente a um desafio com *Salmonella enterica*, foi menor nos animais $TLR4^{-/-}$ que nos animais selvagens (VAZQUEZ-TORRES *et al*., 2004). O lipopolissacarídeo de *A. actinomycetemcomitans* foi capaz de induzir a produção de NO por macrófagos murinos e esta produção foi potencializada na presença de citocinas pró-inflamatórias como IFN-γ e IL-12 (SOSROSENO *et al*., 2002; JO *et al*., 2006). No entanto, após 24 horas de inoculação desta bactéria na cavidade peritoneal, não se observou aumento na produção de NO pelos animais WT ou $TLR4^{-/-}$ em relação aos controles não infectados.

Foi observado ainda que o receptor TLR4 influenciou a atividade de mieloperoxidase (MPO) em neutrófilos estimulados com *A. actinomycetemcomitans in vitro* e após 60 dias da infecção oral com esta bactéria, mas não após inoculação peritoneal. A reduzida atividade desta enzima nos tecidos periodontais pode ser explicada pela menor presença de neutrófilos neste tecido, evidenciada pela análise histológica. No entanto, a produção semelhante de mieloperoxidase entre as células inflamatórias peritoneais pode ser justificada pela ativação celular via moléculas de CD14, TLR2, TLR5 e TLR9 (TSAN *et al*., 2001; ASAI *et al*., 2001; TRIANTAFILOU; TRIANTAFILOU, 2002; NONNENMACHER *et al*., 2003; MILLER; ERNEST; BADER, 2005; KIKKERT *et al*., 2007) induzidas por estruturas imunogênicas como lipoproteínas, fímbria e DNA de *A. actinomycetemcomitans.*

Com base nos resultados obtidos *in vitro* para a produção de NO e atividade de MPO sugerimos que a sinalização via TLR4 é importante para a ativação de neutrófilos, contudo esta via de sinalização não parece ser imprescindível para as funções celulares desempenhadas por macrófagos no contexto de infecção peritoneal por *A. actinomycetemcomitans.* Além disto, as células mantidas em cultura, embora expressem os mesmos receptores necessários à ativação celular *in vivo*, não mantém comunicação com outros tipos celulares presentes no complexo microambiente inflamatório, que é modulada

pelas citocinas e quimiocinas. Esses mecanismos parácrinos de ativação celular podem compensar a falta de ativação pela via TLR4 *in vivo*.

A atividade de células inflamatórias no ambiente inflamatório permite que haja um aumento em sua viabilidade, reduzindo o número de células apoptóticas (EL-KEBIR *et al*., 2008; RAAM *et al.,* 2008). Todavia, *A. actinomycetemcomitans* é capaz de induzir apoptose em leucócitos através da produção de leucotoxina (DILEEPAN *et al.*, 2007). A ausência de TLR4 não alterou a viabilidade de macrófagos e neutrófilos após infecção peritoneal por *A. actinomycetemcomitans*, embora a expressão de TLR4 por neutrófilos e a ativação dessas células através deste receptor tenha sido capaz de inibir a apoptose dessas células após estímulo com LPS de *E. coli* (SABROE *et al*., 2003). De fato, *in vitro* os neutrófilos deficientes de TLR4 foram significativamente mais susceptíveis à apoptose induzida por *A. actinomycetemcomitans*. A expressão de TLR4 em macrófagos, em contraste com a apoptose observada nos neutrófilos, não lhes conferiu aumento na viabilidade após estímulo com *A. actinomycetemcomitans* ou seus antígenos, os quais mostraram-se potentes indutores de apoptose. É possível que haja uma maior expressão de CD18, receptor para leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* (DILEEPAN *et al*., 2007), em macrófagos do que em neutrófilos, permitindo que as caspases 1 e 3 sejam ativadas e que haja um aumento do influxo de cálcio para o interior da célula independentemente da expressão de TLR4 (KELK *et al.*, 2003).

Apesar da produção de NO ser capazes de aumentar a viabilidade de macrófagos *in vitro* e *in vivo* (NAKASHIMA *et al*., 2002), a presença deste mediador inflamatório reduziu a susceptibilidade dos macrófagos à apoptose *in vitro*. Contudo, estímulos inflamatórios como LPS (GRENIER; GRIGNON, 2006; MURRAY; WILTON, 2003), de fatores de crescimento como G-CSF (RAAM *et al*., 2008) e de mediadores antimicrobianos como MPO (EL-KEBIR *et al*., 2008) reduzem a susceptibilidade de células inflamatórias à apoptose, o que justifica o maior número de neutrófilos apoptóticos deficientes de TLR4, os quais apresentaram limitada ativação frente à estimulação por *A. actinomycetemcomitans in vitro*.

A maior viabilidade de neutrófilos e os níveis aumentados na produção de metaloproteinases e espécies reativas de oxigênio nos tecidos periodontais relacionam-se à progressão da DP (BUCHMANN *et al*., 2002; GUSTAFSSON *et al.*, 2006). A manutenção de um ambiente pró-inflamatório, evidenciado pela maior concentração de GM-CSF (produzido por

células epiteliais, fibroblastos, macrófagos) e TNF-α no fluido crevicular destes indivíduos, além da redução na expressão de bax por neutrófilos ativados (GAMONAL *et al*., 2003) reduzem a susceptibilidade dessas células à apoptose nos tecidos gengivais. O aumento na produção de proteinases como elastase e colegenase (YAMALIK *et al*., 2000; UJIIE1 *et al.*, 2007; UJIIE *et al.*, 2008), produtos da atividade de neutrófilos, contribuem para a perda da integridade das estruturas teciduais de suporte dos dentes observada na doença periodontal.

Embora haja um número crescente de estudos sobre a patogênese e progressão da doença periodontal, ainda é necessário que se conheça os diversos aspectos da interação entre a microbiota e a resposta do hospedeiro frente ao desafio gerado pela microbiota oral. Portanto, o papel de TLR4 para o desenvolvimento das alterações periodontais pode fornecer importante ferramenta para ampliar a compreensão dos eventos biológicos relacionados à doença periodontal.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que:

- A sinalização por TLR4 não é a via primordial para o reconhecimento de *A. actinomycetemcomitans.*
- TLR4 está envolvido na efetiva ativação de neutrófilos murinos e no controle da produção de espécies reativas de oxigênio e viabilidade dessas células.
- A fagocitose de *A. actinomycetemcomitans* é parcialmente dependente de TLR4.
- TLR4 está envolvido na maior susceptibilidade à disseminação sistêmica de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
- A ativação de TLR4 relaciona-se aos mecanismos biológicos capazes de induzir a perda óssea alveolar.

REFERÊNCIAS

AAP. Consensus report. Periodontal diseases: epidemiology and diagnosis. Annals of periodontology / The American Academy of Periodontology. 1996;1(1):216-22.

Adams DO, Hamilton TA. The cell biology of macrophage activation. Ann. Rev. Immunol.1984;2:282-318.

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

Akira S, Takeda K. Toll-Like receptor signalling. Nature Reviews Immunology. 2004;4(499-511).

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

American Academy of Periodontology. Consensus report : epidemiology and diagnosis . Ann Peridontol. 1996; 216-222.

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

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

Anand RJ, Kohler JW, Cavallo JA, Li J, Dubowski T, Hackam DJ. Toll-like receptor 4 plays a role in macrophage phagocytosis during peritoneal sepsis. Journal of Pediatric Surgery. 2007;42:927–33.

Asai Y, Ohyama Y, Gen K, Ogawa T. Bacterial Fimbriae and their Peptides Activate Human Gingival Epithelial Cells through Toll-Like Receptor 2. Infection And Immunity. 2001;69(12):7387–95.

Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF Antagonists Inhibit the Inflammatory Response and Bone Loss in Experimental Periodontitis. The Journal of Immunology. 1998;160:403–9.

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

Azuma M. Fundamental mechanisms of host immune response to infection. J Periodont Res. 2006;41:361-173.

Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. Microbes Infect. 2000;2(10):1181-92.

Batista A, Silva T, Chun J, Lara V. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. Oral Dis. 2002;8(5):254-60.

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

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

Blix IJ, Helgeland K. LPS from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and production of nitric oxide in murine macrophages J774. Eur J Oral Sci. 1998;106(1):576-81.

Bogdan C. Nitric oxide and immune response. Nature Immunol. 2002;2(10):907-16.

Borges-Jr. I, Moreira EAM, Filho DW, Oliveira TBD, Silva MBS, Fröde TS. Proinflammatory and Oxidative Stress Markers in Patients with Periodontal Disease. Mediators of Inflammation. 2007:45794-9.

Bostancı N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Tçz H, et al. Differential expression of receptor activator of nuclear factor-κB ligand and osteoprotegerin mRNA in periodontal diseases. J Periodont Res 2007a;42:287–93.

Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Toz H, et al. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio J Clin Periodontol. 2007b;34(370–376).

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

Buchmann R, Hasilik A, Dyke TEV, Lange DE. Amplified Crevicular Leukocyte Activity in Aggressive Periodontal Disease. J Dent Res. 2002;81(10):716-21.

Burch LH, Yang IV, Whitehead GS, Chao FG, Berman KG, Schwartz DA. The transcriptional response to lipopolysaccharide reveals a role for interferon-gamma in lung neutrophil recruitment. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2006;291:L677–L82.

Burns E, Bachrach G, Shapira L, Nussbaum G. Cutting Edge: TLR2 Is Required for the Innate Response to *Porphyromonas gingivalis*: Activation Leads to Bacterial Persistence and TLR2 Deficiency Attenuates Induced Alveolar Bone Resorption. The Journal of Immunology. 2006;177:8296–300.

Campanelli AP, Martins GA, Souto JT, Pereira MS, Livonesi MC, Martinez R, *et al*. Fas-Fas ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. J Infect Dis. 2003;187(9):1496-505.

Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T Cells Selectively Express Toll-like Receptors and Are Activated by Lipopolysaccharide. J Exp Med. 2003;197(4):403-11.

Cardoso CR, Garlet GP, Moreira AP, Júnior WM, MA MAR, Silva JS. Characterization of CD4+CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. J Leukoc Biol. 2008;84(1):311-8.

Chapple CC, Srivastava M, Hunter N. Failure of macrophage activation in destructive periodontal disease. J Pathol. 1998;186(3):281-6.

Chen W, KuoLee R, Shen H, Búsa M, Conlan JW. Toll-like receptor 4 (TLR4) does not confer a resistance advantage on mice against low-dose aerosol infection with virulent type A Francisella tularensis. Microbial Pathogenesis 2004;37:185–91.

Claesson R, Johansson A, Belibasakis G, Hänström L, Kalfas S. Release and activation of matrix metalloproteinase 8 from human neutrophils triggered by the leukotoxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Periodontal Res. 2002;37(5):353-9.

Craig RG, Yip JK, So MK, Boylan RJ, Socransky SS, Haffajee AD. Relationship of destructive periodontal disease to the acute-phase response. J Periodontol. 2003;74(7):1007-16.

D'Aiuto F, Ready D, Tonetti M. Periodontal disease and C-reactive protein-associated cardiovascular risk. J Periodontal Res. 2004;39(4):236-41.

Dale BA, Fredericks LP. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. Curr Issues Mol Biol. 2005;7(2):119-33.

Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. Blood. 2008;112(4):935-45.

Davé S, Dyke TV. The link between periodontal disease and cardiovascular disease is probably inflammation. Oral Diseases. 2008;14:95–101.

Del Fabbro M, Francetti L, Pizzoni L, Weinstein RL. Congenital neutrophil defects and periodontal diseases. Minerva Stomatol. 2000;49(6):293-311.

Delima AJ, Oates T, Assuma R, Schwartz Z, Cochran D, Amar S, *et al*. Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. J Clin Periodontol. 2001;28:233–40.

Dileepan T, Kachlany SC, Balashova NV, Patel J, Maheswaran SK. Human CD18 Is the Functional Receptor for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Leukotoxin. Infection and Immunity. 2007;75(10):4851–6

Doherty, T. M. T-cell regulation of macrophage function. Curr. Opin. Immunol.1995 7:400-4.

Dongari-Bagtzoglou AI, Ebersole JL Gingival fibroblast cytokine profiles in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. J Periodontol. 1996;67(9):871-8.

Dye BA, Choudhary K, Shea S, Papapanou PN. Serum antibodies to periodontal pathogens and markers of systemic inflammation. J Clin Periodontol. 2005;32:1189–99.

Ebersole J, MA MT. The protective nature of host responses in periodontal diseases. Periodontology 2000. 1994;5:112-41.

Ebersole J, Cappelli D. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. Periodontol 2000. 2000;23:19-49.

Ebersole J, Cappelli D, Holt S. Periodontal diseases: to protect or not to protect is the question? Acta odontologica Scandinavica. 2001;59(3):161-6.

Eick S, Pfister W, Sigusch B, Straube E. Phagocytosis of Periodontopathogenic Bacteria by Crevicular Granulocytes Is Depressed in Progressive Periodontitis. Infection. 2000;28(5):301-4.

Elahi S, Pang G, Ashman R, Clancy R Nitric oxide-enhanced resistance to oral candidosis. Immunology 2001 104: 447-454.

El-Kebir D, József L, Pan W, Filep J. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. Circ Res. 2008;103(4):352-9.

Fan J, Malik AB. Toll-like receptor 4 signaling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors. Nature Medicine. 2003;9(3):315-21.

Fang FC. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: Concepts and controversies. Nature Reviews Microbiology. 2004;2:820-32.

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

Fukusaki T, Ohara N, Hara Y, A.Yoshimura, Yoshiura K. Evidence for association between a Toll-like receptor 4 gene polymorphism and moderate/severe periodontitis in the Japanese population. J Periodont Res. 2007;42:541–5.

Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. J Periodont Res. 2001;36:194-203.

Gamonal J, Sanz M, O'Connor A, Acevedo A, Suarez I, Sanz A, *et al.* Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients. J Clin Periodontol. 2003;30:616–23.

Garlet GP. Participação de citocinas na imunomodulação da doença periodontal experimental induzida por *Actinobacillus actinomycetemcomitans.* Ribeirão Preto - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo; 2004.

Garlet G, Cardoso C, Campanelli A, Ferreira B, Avila-Campos M, Cunha F, *et al.* The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. Clinical and experimental immunology. 2007;147(1):128-38.

Garlet G, Cardoso C, Campanelli A, Garlet T, Avila-Campos M, Cunha F, *et al*. The essential role of IFN-gamma in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. Microbes Infect. 2008;10(5):489-96.

Gasparoto T H, Gaziri L C J, Burger E, Almeida R S C, Felipe I. Apoptosis of phagocytic cells induced by *Candida albicans* and production of IL-10. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2004;42:219-224.

Gebska A., Olszanecki R., Korbut R. Endotoxaemia in rats: role of leukocytes sequestration in rapid pulmanary nitric oxide synthase-2 expression. Journal of physiology and pharmacology. 2005; 56(2): 299-311.

Gemmell E, Seymour G. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. Periodontol 2000. 2004;35:21-41.

Genco R. Host responses in periodontal diseases: current concepts. Journal of Periodontology. 1992;63(4):338-55.

Giurko R, Mice lacking inducible nitric oxide synthase demonstrate impaired killing of *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun. 2003 Sep;71(9):4917-24.

Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. J Periodontol. 2003;74(3):391-401.

Green, L.C.; Luzuriaga, K.R.; Wagner, D.A.; RAND, W.; Istan, N.; Young, V.R.; Tannenbaum, S.R. Nitrate biosynthesis in man. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1981. 78: 7764.

Grenier D, Grignon L. Response of human macrophage-like cells to stimulation by Fusobacterium nucleatum ssp. nucleatum lipopolysaccharide. Oral Microbiol Immunol. 2006;21:190–6.

Gustafsson A, Ito H, Asman B, Bergstrom K. Hyper-reactive mononuclear cells and neutrophils in chronic periodontitis. J Clin Periodontol. 2006;33:126-9.

Haslett C, Savill JS, Whyte MK, Stern M, Dransfield I, Meagher LC. Granulocyte apoptosis and the control of inflammation. Philos. Trans. R. Soc. London . 1994,345:327.

Haubek D, Ennibi O-K, Poulsen K, Væth M, Poulsen S, Kilian M. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. Lancet. 2008;371:237–42.

Haubek D, Poulsen K, Kilian M. Microevolution and patterns of dissemination of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. Infect Immun. 2007;75(6):3080-8.

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

Henderson B, Wilson M, Sharp L, Ward JM. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Med Microbiol 2002;51:1013–20.

Hirose M. *et al.* Expression of cytokines and inducible nitric oxide syntase in inflamed gingival tissue. J Periodontol, 2001; 72: 590-597.

Hou L, Sasaki H, Stashenko P. Toll-like receptor 4-deficient mice have reduced bone destruction following mixed anaerobic infection. Infect Immun. 2000;68(8):4681-7.

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

Ito HO, Shuto T, Takada H, Koga T, Aida Y, Hirata M, *et al*. Lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotela intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* promote osteclastic differentiation in vitro. Archs oral Biol. 1996;41(5):439-44.

Jain V, Halle A, Halmen KA, Lien E, Charrel-Dennis M, Ram S, *et al*. Phagocytosis and intracellular killing of MD-2 opsonized Gram-negative bacteria depend on TLR4 signaling. Blood. 2008;111(9):4637-45.

James JA, Poulton KV, Haworth SE, Payne D, McKay IJ, Clarke FM, *et al.* Polymorphisms of TLR4 but not CD14 are associated with a decreased risk of aggressive periodontitis. J Clin Periodontol. 2007;34:111–7.

Ji S, Hyun J, Park E, B.-L. Lee, Kim K-K, Choi Y. Susceptibility of various oral bacteria to antimicrobial peptides and to phagocytosis by neutrophils. J Periodont Res. 2007;42(410–419).

Jo W-S, Yee S-T, Yoon S, Nam B-H, Do E, Jung B-S, *et al*. Immunostimulatory factor isolated from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* stimulates monocytes and inflammatory macrophages. . Microbiol Immunol. 2006;50(7):535-42.

Joshi VM, KL V. The detection of eight putative periodontal pathogens in adult and rapidly pregressive periodontiits patients: an institucional study. Indian J Dent Res. 2007;18(1):6-10.

Kachlany SC, Fine DH, Figurski DH. Secretion of RTX Leukotoxin by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infection and Immunity. 2000;68(11):6094–100.

Kajita K, Honda T, Amanuma R, Domon H, Okui T, Ito H, *et al*. Quantitative messenger RNA expression of Toll-like receptors and interferon-a1 in gingivitis and periodontitis. Oral Microbiol Immunol. 2007;22:398–402.

Kaner D, Bernimoulin J-P, Kleber B-M, Heizmann WR, Friedmann A. Gingival crevicular fluid levels of calprotectin and myeloperoxidase during therapy for generalized aggressive periodontitis. J Periodont Res. 2006;41:132–9.

Kaplan JB, Perry MB, Maclean LL, Furgang D, Wilson ME, Fine DH. Structural and Genetic Analyses of O Polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Serotype f. INFECTION AND IMMUNITY. 2001;69(9):5375–84.

Katsuragi H, Ohtake M, Kurasawa I, Saito K. Intracellular production and extracellular release of oxygen radicals by PMNs and oxidative stress on PMNs during phagocytosis of periodontopathic bacteria. Odontology. 2003;91:13-8.

Kelk P, Johansson A, Claesson R, Hanstrom L, Kalfas S. Caspase 1 Involvement in Human Monocyte Lysis Induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans Leukotoxin. Infection and Immunity. 2003;71(8):4448–55.

Kikkert R, Laine ML, Aarden LA, Winkelhoff Jv. Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. Oral Microbiol Immunol. 2007;22:145–51.

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

Kirby AC, Meghji S, Nair SP, White P, Reddi K, Nishihara T, *et al*. The Potent Bone-resorbing Mediator of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is Homologous to the Molecular Chaperone GroEL. J Clin Invest. 1995;96(1185-1194).

Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. Journal of Leukocyte Biology. 2005;77:598-625.

Kobbe P, Kaczorowski DJ, Vodovotz Y, Tzioupis CH, Mollen KP, Billiar TR, Pape HC. Local exposure of bone components to injured soft tissue induces Toll-like receptor 4-dependent systemic inflammation with acute lung injury. Shock. 2008; 30(6):686-91.

Korostoff J, Yamaguchi N, Miller M, Kieba I, Lally ET. Perturbation of mitochondrial structure and function plays a central role in Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxin-induced apoptosis. Microbial Pathogenesis. 2000;29:267–78.

Lalla E, Lamster IB, Hofmann MA, Bucciarelli L, Jerud AP, Tucker S, Lu Y, Papapanou PN, Schmidt AM. Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003 Aug 1;23(8):1405-11.

Lamaitre, B.; Reichhart, J.M.; Hoffmann, J.A. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94:14614.

Lappin DF, Kjeldsen M, Sander L, Kinane DF. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. J Periodont Res. 2000;35(6):369-73.

Lappin DF, Koulouri O, Radvar M, Hodge P, Kinane DF. Relative proportions of mononuclear cell types in periodontal lesions analyzed by immunohistochemistry. J Clin Periodontol. 1999;26(3):183-9.

Ledder RG, Gilbert P, Huws SA, Aarons L, Ashley MP, Hull PS, et al. Molecular Analysis of the Subgingival Microbiota in Health and Disease. Applied and Environmental Microbiology. 2007;73(2).

Lewkowicz P, Lewkowicz N, Sasiak A, Tchórzewski H. Lipopolysaccharide-Activated CD4+CD25+ T Regulatory Cells Inhibit Neutrophil Function and Promote Their Apoptosis and Death. J Immunol. 2006;177(10):7155-63.

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

Liskmann S, Zilmer M, Vihalemm T, Salum O, Fischer K. Correlation of peri-implant healt and mieloperoxidase levels: a cross-sectional clinical study. Clin implants oral Res. 2004;15(5): 546-52.

Loesche W. Bacterial mediators in periodontal disease. Clin Infect Dis. 1993;16(Suppl 4):S203-10.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193(1):265-75.

Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. J Clin Periodontol. 2005;32(Suppl. 6):57–71.

Mahanonda R, Pichyangkul S. Toll-Like receptors and their role in periodontal health and disease. Periodontology 2000. 2007;43:41-55.

Mandell, GL. Effect of temperature on phagocytosis by human polymorphonuclear neutrophils. Infect Immun. 1975;12(1):221-3.

Marshall RI. Gingival defensins: linking the innate and adaptive immune responses to dental plaque. Periodontol 2000. 2004;35:14-20.

Matejka M, Partykal L, Ulm C, Solar P, Sinzinger H. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. J Periodontal Res. 1998;33(8):517-8.

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

Mattila K, Vesanen M, Valtonen V, Nieminen M, Palosuo T, Rasi V, *et al*. Effect of treating periodontitis on C-reactive protein levels: a pilot study. BMC Infect Dis. 2002;10(2):30

Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. Nat. Rev. Immunol. 2001 1, 135–145.

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

Meyer DH, Rose JE, Lippmann JE, Fives-Taylor PM. Microtubules Are Associated with Intracellular Movement and Spread of the Periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans.* infection and Immunity. 1999;67(12):6518–25.

Miller SI, Ernest RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectiuos disease diversity. Nature Reviews Microbiology. 2005;3:36-47.

Milward MR, Chapple ILC, Wright HJ, Millard JL, Matthews JB, Cooper PR. Differential activation of NF-kB and gene expression in oral epithelial cells by periodontal pathogens. Clinical and Experimental Immunology. 2007;148(2):307-24.

Mintz KP, Fives-Taylor PM. Identification of an Immunoglobulin Fc Receptor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infect Immun. 1994;62(10):4500-5.

Mintz KP, Fives-Taylor PM. Binding of the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to extracellular matrix proteins. Oral Microbiol Immunol. 1999;14:109-16.

Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. TRENDS in Molecular Medicine. 2007;13(3):108-16

.
Miyasaki KT, Wilson ME, Genco RJ. Killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by the Human Neutrophil Myeloperoxidase-Hydrogen Peroxide-Chloride System. Infection and Immunity. 1986;53(1):161-5.

Miyasaki KT, Zambon JJ, Jones CA, Wilson ME. Role of High-Avidity Binding of Human Neutrophil Myeloperoxidase in the Killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infection and Immunity. 1987;55(5):1029-36.

Morikawa M, Chiba T, Tomii N, Sato S, Takahashi Y, Konishi K, *et al*. Comparative analysis of putative periodontopathic bacteria by multiplex polymerase chain reaction. J Periodont Res. 2008;43:268–74.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full sprectrum of macrophage activation. Nature Reviews Immunology. 2008;8:958-69.

Muller HP, Heinecke A, Fuhrmann A, Eger T, Zoller L. Intraoral distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in young adults with minimal periodontal disease. J Periodont Res. 2001;36:114-23.

Murray DA, Wilton JMA. Lipopolysaccharide from the Periodontal Pathogen Porphyromonas gingivalis Prevents Apoptosis of HL60-Derived Neutrophils In Vitro. Infection and Immunity. 2003;71(12):7232–5.

Nakamura H, Fukusaki Y, Yoshimura A, Shiraishi C, Kishimoto M, Kaneko T, *et al.* Lack of Toll-like receptor 4 decreases lipopolysaccharide-induced bone resorption in C3H/HeJ mice in vivo. Oral Microbiol Immunol. 2008;23:190–5.

Nakashima K, Tomioka J, Kato S, Nishihara T, Kowashi Y. Nitric Oxide-mediated protection of *A. actinomycetemcomitans*-infected murine macrophages against apoptosis. Nitric oxide: Biology and chemistry. 2002; 6: 61-68.

Nathan CF, Murray H,. Cohn ZA. The macrophage as an effector cell. N. Engl. J. Med.1980 303:622-6.

Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. Nat Rev Immunol. 2006;6(3):173-82.

Netea MG, Graaf Caavd, Vonk AG, Verschueren I, Meer J, Kullberg BJ. The Role of Toll-like Receptor (TLR) 2 and TLR4 in the Host Defense against Disseminated Candidiasis. The Journal of Infectious Diseases. 2002;185:1483–9.

Neufert C, Pai K.; Noss EH; Berger M.; Boom WH.; Harding CV. *Mycobacterium tuberculosis* 19-kDa lipoprotein promotes neutrophil activation. J. Immunol. 2001. 167, 1542–1549.

Noack B, Genco R, Trevisan M, Grossi S, Zambon J, Nardin ED. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. J Periodont. 2001;72(9):1221-7.

Nonnenmacher C, Dalpke A, Zimmermann S, Flores-de-Jacoby L, Mutters R, Heeg K. DNA from periodontopathogenic bacteria is immunostimulatory for mouse and human immune cells. Infection and Immunity. 2003;71(2):850–6.

Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, *et al.* The Extra Domain A of Fibronectin Activates Toll-like Receptor 4. J Biol Chem. 2001;276(13):10229-33.

Oksaharju A, Lappalainen J, Tuomainen AM, Pussinen PJ, Puolakkainen M, Kovanen PT, Lindstedt KA. Proatherogenic lung and oral pathogens induce an inflammatory response in human and mouse mast cells. J Cell Mol Med. 2008; 24.

Ooshima T, Nishiyama N, Hou B, Tamura K, Amano A, Kusumoto A, *et al.* Occurrence of periodontal bacteria in healthy children: a 2-year longitudinal study. Community Dent Oral Epidemiol. 2003;31(6):417-25.

Page R. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology 1998;3(1):108-20.

Parise-Fortes MR, Pereira da Silva MF, Sugizaki MF, Defaveri J, Montenegro MR, *et al.* Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. Med Mycol 2000; 38: 51-60.

Permpanich P, Kowolik MJ, Galli DM. Resistance of fluorescent-labelled *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains to phagocytosis and killing by human neutrophils. Cellular Microbiology. 2006;8(1):72–84.

Pierce, C. W. Macrophages: modulators of immunity. Am. J. Pathol.1980*,* 98:10-28.

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu M-Y, Huffel CV, Xin Du DB, et al. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. SCIENCE 1998;282(2085-2088).

Pryshchep O, Ma-Krupa W, Younge BR, Goronzy JJ, Weyand CM. Vessel-specific Toll-like receptor profiles in human medium and large arteries. Circulation. 2008;118(12):1276-84.

Pussinen PJ, Tuomisto K, Jousilahti P, Havulinna AS, Sundvall J, Salomaa V. Endotoxemia, immune response to periodontal pathogens, and systemic inflammation associate with incident cardiovascular disease events. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007; 27(6):1433-9.

Raam Bv, Drewniak A, Groenewold V, Berg Tvd, Kuijpers T. Granulocyte colony-stimulating factor delays neutrophil apoptosis by inhibition of calpains upstream of caspase-3. Blood. 2008;112(5):2046-54.

Remer KA, Brcic M, Jungi TW. Toll-like receptor-4 is involved in eliciting an LPS-induced oxidativeburst in neutrophils. Immunology Letters 2003;85:75-80.

Rosenthal, A. S. Regulation of the immune response - role of the macrophage. N. Engl. J. Med.1980 303:1153-6.

Sabroe I, Prince LR, Jones EC, Horsburgh MJ, Foster SJ, Vogel SN, et al. Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. J Immunol. 2003;170(10):5268-75.

Sakai VT, Campos MR, Machado MA, Lauris JR, Greene AS, Santos CF. Prevalence of four putative periodontopathic bacteria in saliva of a group of Brazilian children with mixed dentition: 1-year longitudinal study. Int J Paediatr Dent. 2007;17(3):192-9.

Sakamoto W, Fujii Y, Kanehira T, Asano K, Izumi H. A novel assay system for myeloperoxidase activity in whole saliva. Clinical Biochemistry. 2008;41:584–90.

Sakurai K, Wang D, Suzuki JI, Umeda M, Nagasawa T, Yuichi I, *et al*. High Incidence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Infection in Acute Coronary Syndrome. Int Heart J. 2007;48(6):663-75.

Sbordone L, Bortolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. Clinical oral investigations. 2003;7(4):181-8.

Schacher B, Baron F, Roßberg M, Wohlfeil M, Arndt R, Eickholz P. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as indicator for aggressive periodontitis by two analysing strategies. J Clin Periodontol. 2007;34:566–73.

Schenkein H. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. Periodontology 2000. 2006;40:77-93.

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

Shin J, Ji S, Choi Y. Ability of oral bacteria to induce tissue-destructive molecules from human neutrophils. Oral Diseases 2008;14:327–34.

Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. J Dent Res. 2007;86(4):306-19.

Slade GD, Offenbacher S, Beck JD, Heiss G, Pankow JS. Acute-phase inflammatory response to periodontal disease in the US population. J Dent Res. 2000 Jan;79(1):49-

Smith PC, Muñoz VC, Callados L, Oyarzún AD. *In Situ* detection of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in gingival epithelium in human periodontal disease. J Periodont Res. 2004;39:87-92.

Socransky S, Haffajee A. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontology 2000. 2002;28:12-55.

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

Sosroseno W, Barid I, Herminajeng E, Susilowati H. Nitric oxide production by a murine macrophage cell line (RAW264.7) stimulated with lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Oral Microbiol Immunol 2002;17:72–8.

Sosroseno W, Herminajeng E. The role of macrophages in the inducion of murine immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Journal of Medical Microbiology. 2002;51:581-8.

Sosroseno W, Musa M, Ravichandran M, Ibrahim M, Bird P, Seymour G. Effect of inhibition of inducible nitric oxide synthase (iNOS) on the murine splenic immune response induced by *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. Eur J Oral Sci. 2008;116(1):31-6.

Springer TA, Thompsom WS, Miller LJ, Schmalstieg PC. Anderson DC. Inherited deficiency of the Mac-1, LFA-1, p150,95 glycoprotein family and its molecular basis. J. exp. Med. 1994, 160: 1901-1918.

Sreenivasan PK, Meyer DH, Fives-Taylor PM. Requirements for invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infection and Immunity. 1993;61(4):1239-45.

Stepanovic S, Tosîc T, Savic B, Jovanovic M, K'ouas G, Carlier J-P. Brain abscess due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. APMIS. 2005;113:225–8.

Stossel ,T. P. Phagocytosis: Recognition and ingestion. Semin. Hematol.1975 12:83-116.

Stossel, T. P. Phagocytosis. New Engl. J. Med.1974, 290:717-23.

Stuart LM, Ezekowitz RA. Phagocytosis and comparative innate immunty: learning on the fly. Nature Reviews Immunology. 2008;8:131-41.

Sultzer B. Genetic control of leucocyte responses to endotoxin. Nature. 1968;219(5160):1253-4.

Sun Y, Shu R, Zhang M-Z, Wu A-P. Toll-like receptor 4 signaling plays a role in triggering periodontal infection. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008;52(3):362-9.

Susin C, Oppermann RV, Haugejorde O, Albandar JM. Periodontal attachment loss attributable to cigarette smoking in an urban Brazilian population. J Clin Periodontol. 2004 Nov;31(11):951-8.

Takeda K, Akira S. Microbial recognition by Toll-like receptors. J. Dermatol. Sci. 2004 34, 73–82.

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

Teng YT. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14(4):237-52.

Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, et al. Oligosaccharides of Hyaluronan Activate Dendritic Cells via Toll-like Receptor 4. J Exp Med. 2002;195(99-111).

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

Tietze K, Dalpke A, Morath S, Mutters R, Heeg K, Nonnenmacher C. Differences in innate immune responses upon stimulation with gram-positive and gram-negative bacteria. J Periodontal Res. 2006;41(5):447-54.

Tonetti MS, Imboden MA, Gerber L, Lang NP, Laissue J, Mueller C. Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. Infect Immun. 1994;62(9):4005-14.

Trevani AS, Chorny A, Salamone G, Vermeulen M, Gamberale R, *et al.* Bacterial DNA activates human neutrophils by a CpG-independent pathway. Eur. J. Immunol.2003 33, 3164–3174.

Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognation: CD14, TLRs and LPS-activation cluster. Trends in immunology. 2002;23(6):301-4.

Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. Nature Reviews. 2007;7:179-90.

Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. FEMS Immunology Medical Microbiology. 2007;51:443-52.

Tsan M-F, Clark RN, Goyert SM, White JE. Induction of TNF-α and MnSOD by endotoxin: role of membrane CD14 and Toll-like receptor-4. Am J Physiol Cell Physiol. 2001;280:C1422–C30.

Turina M, Miller FN, McHugh PP, Cheadle WG, Polk-Jr. HC. Endotoxin inhibts apoptosis but induces primary necrosis in neutrophils. Inflammation 2005;29(1):55-63.

Ujiie Y, Oida S, Gomi K, Arai T, Fukae M. Neutrophil elastase is involved in the initial destruction of human periodontal ligament. J Periodont Res. 2007;42:325–30.

Ujiie Y, Shimada A, Komatsu K, Gomi K, Oida S, Arai T, *et al.* Degradation of noncollagenous components by neutrophil elastase reduces the mechanical strength of rat periodontal ligament. J Periodont Res. 2008;43:22–31.

Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. Curr. Opin. Immunol.2002 14, 103–110.

Vazquez-Torres A, Vallance BA, Bergman MA, Finlay BB, Cookson BT, Jones-Carson J, et al. Toll-Like Receptor 4 Dependence of Innate and Adaptive Immunity to Salmonella: Importance of the Kupffer Cell Network. The Journal of Immunology. 2004;172:6202–8.

Vecchiarelli A, Retini C, Monari C, Tascini C, Bistoni F, Kozel TR. Purified capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces interleukin-10 secretion by human monocytes. Infect Immun 1996; 64: 2846-9.

Viallard JF, Bonnet S, Couzi L, Deminière C, Miossec V, Mercié P, et al. Glomerulonephritis caused by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* mimicking c-ANCA-positive vasculitis. Nephrol Dial Transplant 2002;17:663-5.

Xiong J, Kang K, Liu L, Yoshida Y, Cooper KD, Ghannoum MA. *Candida albicans* and *Candida krusei* differentially induce human blood mononuclear cell Interleukin-12 and Gamma Interferon production. Infect Immun. 2000; 68: 2464-9.

Yamaguchi N, Kukita T, Li Y-J, Argueta JGM, Saito T, Hanazawa S, et al. Adiponectin inhibits osteoclast formation stimulated by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2007;49:28–34.

Yamalik N, Çaglayan F, Kilinç K, Kilinç A, Tümer C. The importance of data presentation regarding Gingival crevicular fluid myeloperoxidase and elastase-like activity in periodontal disease and health status. J Periodont. 2000;71(3):460-7.

Yamamoto S, Mogi M, Kinpara K, Ishihara Y, N NU, KAmano, et al. Anti-proliferative capsular-like polysaccharide antigen from Actinobacillus actinomycetemcomitans induces apoptotic cell death in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. J Dent Res. 1999;78(6):1230-7.

Yamazaki K, Yoshie H, Seymour G. T cell regulation of the immune response to infection in periodontal diseases. Histology and histopathology. 2003;18(3):889-96.

Yanagita M *et al*. IL-15 up-regulates iNOS expression and NO production by gingival epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Sep 20;297(2):329-34.

Yang HW, Asikainen S, Doğan B, Suda R, Lai CH. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Serotype b to Aggressive Periodontitis: Frequency in Pure Cultured Isolates. J Periodontol. 2004;75(4):592-9.

Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, *et al.* Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;84(24):9233-7.

Younes R, Ghorra C, Khalife S, Igondjo-Tchen-Changotade S, Yousfi M, C.Willig, *et al.* Pertinent cell population to characterize periodontal disease. Tissue and Cell. 2008;in press.

Yu X, Graves DT. Fibroblasts, mononuclear phagocytes, and endothelial cells express monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflamed human gingiva. J Periodontol. 1995;66(1):80-8.

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

Wahl SM, Hunt DA, Wong HL, Dougherty S, McCartney-Francis N, Wahl LM, et al. Transforming growth factor-beta is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation. J Immunol. 1988 May 1;140(9):3026-32.

Winkelhoff AJV, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphiromonas gingivalis* in nonoral infections. Periodontol 2000. 1999;20:122-35.

Zou N, Ao L, Cleveland-Jr JC, Yang X, Su X, Cai G-Y, et al. Critical role of extracellular heat shock cognate protein 70 in the myocardial inflammatory response and cardiac dysfunction after global ischemia-reperfusion. Am J Physiol Heart Circ Physiol 294: . 2008;294:H2805–H13.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo