

VERÔNICA VARGAS HOREWICZ

**EFEITOS DE DIFERENTES BACTÉRIAS DA MICROBIOTA PERIODONTAL NO  
FENÓTIPO E FUNÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DE INDIVÍDUOS COM  
PERIODONTITE CRÔNICA OU SAUDÁVEIS**

CAMPINAS  
2008

VERÔNICA VARGAS HOREWICZ

**EFEITOS DE DIFERENTES BACTÉRIAS DA MICROBIOTA PERIODONTAL NO  
FENÓTIPO E FUNÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DE INDIVÍDUOS COM  
PERIODONTITE CRÔNICA OU SAUDÁVEIS**

Dissertação apresentada ao Centro de  
Pós-Graduação / CPO São Leopoldo  
Mandic, para obtenção do grau de Mestre  
em Odontologia.

Área de Concentração: Periodontia

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Ramos  
Cury

CAMPINAS  
2008

**Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca "São Leopoldo Mandic"**

H811e Horewicz, Verônica Vargas.  
Efeito de diferentes bactérias da microbiota periodontal no fenótipo e função das células dendríticas de indivíduos com periodontite crônica ou saudáveis / Verônica Vargas Horewicz. – Campinas: [s.n.], 2008.  
123f.: il.

Orientador: Patrícia Ramos Cury.  
Dissertação (Mestrado em Periodontia) – C.P.O. São Leopoldo Mandic – Centro de Pós-Graduação.

1. Bactérias. 2. Periodontite. 3. Periodontia. I. Cury, Patrícia Ramos. II. C.P.O. São Leopoldo Mandic – Centro de Pós-Graduação. III. Título.

**FOLHA DE APROVAÇÃO**  
**C.P.O. - CENTRO DE PESQUISAS ODONTOLÓGICAS**  
**SÃO LEOPOLDO MANDIC**

**Folha de Aprovação**

A dissertação intitulada: **“EFEITOS DE BACTÉRIAS DA MICROBIOTA PERIODONTAL NO FENÓTIPO E FUNÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DE INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE CRÔNICA OU SAUDÁVEIS”** apresentada ao Centro de Pós-Graduação, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de concentração: **Periodontia** em \_\_/\_\_/\_\_, à comissão examinadora abaixo denominada, foi aprovada após liberação pelo orientador.

---

Prof. (a) Dr (a)  
Orientador

---

Prof. (a) Dr (a)  
1º Membro

---

Prof. (a) Dr (a)  
2º Membro

***Dedico esta dissertação a minha mãe e ao meu pai, que sempre me incentivaram desde pequena a estudar e a seguir os meus sonhos, não importando as dificuldades da vida. Obrigada por sempre me guiarem no caminho do conhecimento e por acreditarem na minha capacidade.***

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela força para suportar todos os percalços do caminho.

À minha mãe Elaine e aos meus irmãos Vitor e Vinícius pelo amor, carinho, apoio, amizade e, principalmente, pelo aprendizado em família, que é a principal escola da vida. Mãe, obrigada por suportar sem reclamar o meu mau humor.

Aos meus queridos avós Moysés e Eva, por todo incentivo e carinho dispensados em todos os momentos da vida.

À Alethéia, Vanessa e Guilherme, que sempre estiveram ali todas as vezes que as forças me faltaram, sempre com palavras de incentivo e carinho.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Patricia Ramos Cury. Agradeço-a pela paciência e dedicação na transmissão de sua experiência e conhecimentos, e pelas oportunidades concedidas. Obrigada por ter ultrapassado o limite de mestre e ter se tornado companheira.

Ao Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e por toda orientação concedida.

À toda equipe do Laboratório de Imunobiologia de Tumores, que mais que colegas de trabalho, são amigos: Ana Paula, João Paulo (pela grande ajuda no citômetro, pelas altas horas e fins de semana de trabalho), Márcio, Renato, Gabi, Bruno, Marisa, Patrícia e Célia. Meu muito obrigada a todos pelas inúmeras horas de trabalho, risos e brincadeiras.

À Karla Regulín, por toda ajuda com os meios de cultivo das bactérias e pela boa companhia.

Aos doadores de sangue que aceitaram participar deste estudo. A Ciência depende de pessoas que, de alguma forma trabalham e se dedicam em prol de um conhecimento que, eventualmente, não contemplarão.

Aos funcionários do Hemocentro da Unicamp, pela ajuda na triagem e pelo indispensável auxílio no processamento das bolsas de Buffy-coat.

Ao Coordenador do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Hemocentro da Unicamp, Dr. Marcelo Addas, pela contribuição na realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Karina Salmazi e Fernanda Bruno Romano, pela imensa contribuição na aprendizagem da citometria de fluxo.

Aos professores Dr. Julio César Joly, Dr. Robert Carvalho e Danilo Ciotti, pelos conhecimentos ministrados.

À FAPESP pelo apoio científico e financeiro.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

***“Ninguém poderá jamais aperfeiçoar-se  
se não tiver o mundo como mestre.  
A experiência se adquire na prática.”***

William Shakespeare  
*Os Dois Cavalheiros de Verona (1595)*  
Ato I, Cena III: Antônio

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do *Streptococcus sanguinis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Treponema denticola* sobre o fenótipo e função de células dendríticas (DCs) geradas *in vitro* a partir de células mononucleares sangüíneas periféricas (PBMC) de indivíduos com periodontite crônica comparados com indivíduos periodontalmente saudáveis. Sangue foi obtido de doadores voluntários sistemicamente saudáveis com diagnóstico de saúde periodontal (N=5) ou periodontite crônica (N=5). PBMC foram isoladas e diferenciadas em DCs, pulsadas com lisado de *S. sanguinis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* ou *T. denticola*, marcadas com os anticorpos monoclonais anti-CD1a, anti-CD14, anti-CD80, anti-CD86, anti-CD83, anti-CD11c, anti-CCR7, anti-CD123 e anti-HLA-DR e analisadas por citometria de fluxo. MDDCs foram co-cultivadas com linfócitos T alogênêicos e a proliferação dos linfócitos T foi avaliada. IL-10, IL-12 e IFN $\gamma$  foram quantificadas nos sobrenadantes das MDDCs e dos linfócitos. Teste t não-pareado ou Mann-Whitney foi empregado para comparação entre grupos. No grupo saudável, *S. sanguinis* aumentou a diferenciação das DCs, a expressão de IL-10 pelas MDDCs e a proliferação de linfócitos, mas diminuiu a ativação das MDDCs; no grupo periodontite, a diferenciação e expressão de IL-10 foram diminuídas e a ativação das MDDCs, proliferação de linfócitos e produção de IFN $\gamma$  pelos linfócitos aumentadas. *P. gingivalis* teve efeito semelhante ao *S. sanguinis* na diferenciação e expressão de IL-10, além de aumentar a expressão da molécula co-estimuladora CD80 no grupo periodontite e diminuir no grupo saudável. *P. intermedia* teve efeito similar à *P. gingivalis* na expressão da molécula CD80 e teve efeito similar ao *S. sanguinis* quanto a ativação das MDDCs e produção de IFN $\gamma$  pelos linfócitos. Por outro lado, o *T. denticola* aumentou a expressão da molécula co-estimuladora CD86 e ativação no grupo saudável e diminuiu no grupo periodontite, porém não afetou a proliferação de linfócitos no grupo saudável e aumentou no grupo periodontite; a expressão de IFN $\gamma$  pelos linfócitos foi aumentada em ambos os grupos. Pode-se concluir que o fenótipo induzido nas DCs dos indivíduos saudáveis parece promover tolerância, independente da espécie bacteriana, enquanto, nas DCs dos indivíduos com periodontite crônica parece promover respostas heterogêneas, o que pode explicar, parcialmente, o desenvolvimento e progressão da doença.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of *Streptococcus sanguinis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Treponema denticola* on the phenotype and function of dendritic cells (DCs) generated *in vitro* from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of the individuals with chronic periodontitis compared to individuals with periodontal health. Blood was obtained from systemically healthy volunteers with diagnosis of periodontal health (N=5) or chronic periodontitis (N=5). PBMC were isolated and differentiated in DCs, pulsed with *S. sanguinis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* and *T. denticola* lysates, marked with monoclonal antibodies anti-CD1a, anti-CD14, anti-CD80, anti-CD86, anti-CD83, anti-CD11c, anti-CCR7, anti-CD123 and anti-HLA-DR and analysed by flow cytometry. MDDCs were co-cultured with allogeneic T cells and T cell proliferation was assessed. IL-10, IL-12 and IFN $\gamma$  were quantified in MDDCs and T cell supernatants. Unpaired t-test or Mann-Whitney test was used to comparisons between groups. In healthy group, *S. sanguinis* increased differentiation of DCs, IL-10 expression by MDDCs and lymphocyte proliferation, but decreased MDDCs activation; in periodontitis group, the differentiation and IL-10 expression were decreased and MDDCs activation, lymphocyte proliferation and IFN $\gamma$  production by lymphocytes were increased. *P. gingivalis* had a similar effect of *S. sanguinis* on differentiation and IL-10 expression. Moreover, it increased CD80 costimulatory molecule expression in periodontitis group and decreased in healthy group. *P. intermedia* had a similar effect of *P. gingivalis* on CD80 molecule expression and had a similar effect of *S. sanguinis* regarding MDDCs activation and IFN $\gamma$  production by lymphocytes. On the other hand, *T. denticola* increased CD86 costimulatory molecule expression and MDDCs activation in healthy group and decreased in periodontitis group, but it did not affect the lymphocyte proliferation in healthy group and increased in periodontitis group; IFN $\gamma$  expression by lymphocytes was increased in both groups. In conclusion, the phenotype induced in DCs from healthy individuals seems to promote tolerance, independent of bacteria specie, while DCs from chronic periodontitis individuals seems to promote heterogeneous responses, which may explain, in parts, disease development and progression.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. actinomycetemcomitans</i>	- <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
APCs	- Células Apresentadoras de Antígenos
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
BHI	- Infusão de Cérebro e Coração
BSA	- Soro-Albumina Bovina
CCR	- Receptor para Quimiocina
CD	- <i>Cluster of Differentiation</i>
Células T <sub>reg</sub>	- Células T reguladoras
CFSE	- <i>Carboxy Fluoroscein Succinimidyl Ester</i>
DCs	- Células Dendríticas
DNA	- Ácido Desoxiribonucléico
FSC	- <i>Forward Scatter</i> - tamanho celular
GM-CSF	- Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos e Granulócitos
HLA-DR	- Molécula do MHC de classe II
IFN $\gamma$	- Interferon gama
IL	- Interleucina
imDCs	- Células Dendríticas imaturas
LPS	- Lipopolissacarídeo
LTA	- Ácido Lipoteicóico
M-CSF	- Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos
MDDCs	- Células Dendríticas Derivadas de Monócitos
MHC II	- Molécula do Complexo principal de Histocompatibilidade de classe II
MIF	- Média da Intensidade de Fluorescência
mRNA	- Ácido Ribonucléico Mensageiro
<i>P. gingivalis</i>	- <i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermédia</i>	- <i>Prevotella intermedia</i>
PBMC	- Células Mononucleares de Sangue Periférico
PBS	- Solução Salina Tamponada com Fosfatos
PCR	- Reação de Polimerização em Cadeia
PGE2	- Prostaglandina E2

PHA	- Fitohemaglutinina
Resposta T <sub>H</sub>	- Resposta T <i>helper</i>
<i>S. sanguinis</i>	- <i>Streptococcus sanguinis</i>
SBF	- Soro Fetal Bovino
SSC	- <i>Side Scatter</i> - granulidade celular
<i>T. denticola</i>	- <i>Treponema denticola</i>
TCR	- Receptor de Célula T
TGF-β	- Fator de Crescimento Transformador-beta
TLRs	- Receptores do tipo Toll
TNF-α	- Fator de Necrose Tumoral-alfa

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 Etiologia da doença periodontal</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1.1 Patógenos periodontais</b> .....	<b>24</b>
2.1.1.1 Streptococcus sanguinis.....	24
2.1.1.2 Porphyromonas gingivalis .....	24
2.1.1.3 Prevotella intermedia.....	26
2.1.1.4 Treponema denticola.....	27
<b>2.2 Células dendríticas</b> .....	<b>27</b>
<b>2.2.1 Origem e heterogeneidade das subpopulações de células dendríticas</b> ....	<b>29</b>
<b>2.2.2 Captura de antígenos pelas células dendríticas</b> .....	<b>32</b>
<b>2.2.3 Maturação e migração das células dendríticas</b> .....	<b>34</b>
<b>2.2.4 Células dendríticas e patógenos</b> .....	<b>35</b>
<b>2.2.5 Ativação de células T</b> .....	<b>37</b>
<b>2.3 Células dendríticas e periodontite</b> .....	<b>43</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>3.1 Hipóteses</b> .....	<b>51</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>52</b>
<b>4.1 Casuística</b> .....	<b>52</b>
<b>4.2 Coleta de sangue</b> .....	<b>53</b>
<b>4.3 Diferenciação de células dendríticas a partir de monócitos do sangue periférico in vitro</b> .....	<b>53</b>
<b>4.4 Preparo das bactérias</b> .....	<b>56</b>
<b>4.5 Análise de marcadores de maturação por Citometria de Fluxo</b> .....	<b>58</b>
<b>4.5.1 Análise das moléculas de superfície</b> .....	<b>58</b>
<b>4.6 Separação de linfócitos T para ensaio proliferativo</b> .....	<b>60</b>
<b>4.6.1 Preparação das hemácias de carneiro</b> .....	<b>60</b>
<b>4.6.2 Recuperação de linfócitos T</b> .....	<b>61</b>
<b>4.7 Avaliação da atividade aloestimuladora das DCs</b> .....	<b>62</b>
<b>4.8 Detecção da produção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)</b> .	<b>62</b>
<b>4.9 Análise estatística</b> .....	<b>63</b>
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>65</b>
<b>5.1 Rendimento e morfologia das MDDCs</b> .....	<b>66</b>
<b>5.2 Diferenciação e maturação das MDDCs</b> .....	<b>67</b>
<b>5.2.1 Streptococcus sanguinis</b> .....	<b>67</b>
<b>5.2.2 Porphyromonas gingivalis</b> .....	<b>68</b>
<b>5.2.3 Prevotella intermedia</b> .....	<b>69</b>
<b>5.2.4 Treponema denticola</b> .....	<b>70</b>
<b>5.3 Proliferação das células T alogênicas</b> .....	<b>71</b>
<b>5.4 Produção de IFN<math>\gamma</math>, IL-10 e IL-12 pelas MDDCs</b> .....	<b>72</b>
<b>5.5 Produção de IFN<math>\gamma</math>, IL-10 e IL-12 pelos linfócitos T alogênicos</b> .....	<b>74</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>77</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>88</b>
<b>ANEXO A - Folha de Aprovação do Comitê de Ética</b> .....	<b>100</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A periodontite crônica é uma doença infecciosa, inflamatória, causada por bactérias, que afeta os tecidos de suporte dos dentes (Socransky, 1977) e atinge até 75% da população no mundo (Brown, Loe, 1993; Albandar et al., 1999; Susin et al., 2004). Bactérias como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, dentre outras, acumuladas no biofilme dental, induzem respostas imunes inespecíficas e específicas, responsáveis pela proteção do hospedeiro, mas também pela destruição do periodonto (Cutler et al., 1995). A destruição periodontal atribuída à ação bacteriana direta é muito pequena, quando comparada à destruição resultante da resposta imunoinflamatória (Socransky et al., 1998). Entretanto, os mecanismos pelos quais determinados periodontopatógenos induzem um tipo destrutivo de resposta imune nas periodontites não são conhecidos (Pulendran et al., 2001).

Células dendríticas imaturas estão estrategicamente localizadas em tecidos que representam rotas de entrada de patógenos (pele e superfície mucosa), onde elas monitoram continuamente o ambiente através da internalização de partículas e produtos solúveis (Banchereau, Steinman, 1998). A maturação de DCs está associada a uma redução de sua capacidade endocítica e fagocítica, aumento na produção de citocinas inflamatórias e aquisição da capacidade de migração. Além disso, a maturação de DCs também é caracterizada pelo aumento da expressão de moléculas de classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC II) e de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86 e CD40) na superfície destas células, que as torna capazes de ativar de forma efetiva linfócitos T naive ou de memória (Caux et al., 1994; Banchereau et al., 2000).

O envolvimento das DCs na patogênese das doenças periodontais inflamatórias é bastante evidente (Gomez et al., 1995; Séguier et al., 2000a; Séguier et al., 2000b; Séguier et al., 2000c; Jotwani et al., 2001; Cirrincione et al., 2002; Séguier et al., 2003; Aroonrerk et al., 2003; Jotwani, Cutler, 2003; Cury et al., 2008a; Cury et al., 2008b). O epitélio gengival parece ser um sítio de tráfego ativo de células de Langerhans (CD1a+), enquanto que a lâmina própria, na periodontite crônica, contém células dendríticas maduras (CD83+) e DCs dérmicas, além de células CD1a+. Sugere-se que as células de Langerhans do epitélio, após exposição aos patógenos periodontais, dão origem às DCs maduras. Essa maturação das células de Langerhans em DCs maduras parece ocorrer *in situ* (Cutler et al., 1999), mas também é provável que, após o contato com os patógenos periodontais, elas migrem para os linfonodos, onde amadurecem. Existe pouquíssima informação, entretanto, sobre o papel das células dendríticas na polarização da resposta imunológica em indivíduos susceptíveis à periodontite crônica (Jotwani, Cutler, 2003). Indivíduos com periodontite crônica apresentam elevados níveis locais de citocinas  $T_H1$  e  $T_H2$  (Seymour et al., 1993; Gemmel et al., 2002) e um aumento do número local de subpopulações de DCs (Cutler et al., 1999; Jotwani et al., 2001; Cirrincioni et al., 2002; Mahanonda et al., 2002), células T CD4+ (Seymour et al., 1993; Jotwani et al., 2001; Cirrincioni et al., 2002; Gemmel et al., 2002) e células B/ plasmócitos (Seymour et al., 1993; Cutler et al., 1995). Entretanto, a falta de polarização na produção das citocinas em resposta à periodontite crônica pode ser reflexo da complexidade da infecção polimicrobiana oral (Podmore et al., 2001) e dos diferentes estágios de progressão da doença durante a coleta da amostra de citocinas (Gemmel et al., 2002).

*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Treponema denticola* estão entre os principais patógenos responsáveis pelo aparecimento e desenvolvimento da periodontite crônica, enquanto que *Streptococcus sanguinis* tem sido associado com saúde periodontal (Socransky et al., 1998). Sendo assim, nossa hipótese é que *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. denticola* são capazes de induzir alterações fenotípicas e funcionais nas células dendríticas diferentes daquelas induzidas por *S. sanguinis* e que estas diferentes respostas também sejam diferentes em indivíduos susceptíveis a periodontite crônica e em indivíduos não-susceptíveis.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Etiologia da doença periodontal

A importância da presença da placa bacteriana para o desenvolvimento da gengivite foi demonstrada por Løe et al., em 1965, ao realizarem um estudo clínico em 12 indivíduos nos qual o acúmulo de placa bacteriana ao longo da margem gengival demonstrou íntima relação com a inflamação gengival. A suspensão da escovação por 28 dias resultou em rápido acúmulo de placa nos dentes. A gengivite se desenvolveu em todos os indivíduos no período de 10 a 21 dias. O restabelecimento dos procedimentos de higiene oral removeram a placa e reverteram a gengivite. Amostras das placas dentárias obtidas durante os 28 dias de experimentação revelaram uma colonização inicial por cocos Gram positivos e bastonetes, seguida por cocos Gram negativos e bastonetes, então fusobactérias e filamentos, e finalmente espirilos e espiroquetas. O aparecimento da gengivite clínica foi relacionada à colonização por formas Gram negativas.

Ao fazer uma revisão de literatura, Socransky (1970), constatou que todas as formas de doenças periodontais em humanos são provavelmente de etiologia bacteriana, onde mais de um tipo de microrganismo no sulco gengival poderia iniciar a destruição periodontal, necessitando, entretanto, como pré-requisito para o início da destruição do periodonto a habilidade de se acumularem na placa. Todavia, esse mecanismo ainda não estava claro.

Ainda no mesmo ano, Bahn (1970) atribuiu aos microrganismos da placa subgengival o principal fator etiológico da doença periodontal e sua progressão poderia ser alterada por algumas situações como: irritantes físicos, trauma oclusal,

doenças sistêmicas, defeitos genéticos, alterações hormonais e desordens nutricionais que promoveriam a quebra do equilíbrio entre as bactérias e a defesa do hospedeiro.

De acordo com Snyderman (1972), a destruição dos tecidos periodontais seria resultante do processo inflamatório em resposta às defesas do hospedeiro, e os microrganismos seriam responsáveis por desencadear esse processo, com a liberação de seus produtos tóxicos, como as endotoxinas. A interação das endotoxinas com o complemento resultaria na liberação de produtos ativos que induziriam a permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa, degranulação dos mastócitos e quimiotaxia dos neutrófilos e macrófagos. A reação inflamatória promoveria a liberação de células inflamatórias, produtos intracelulares, tais como histamina, heparina e potentes enzimas lisossomais proteolíticas que por sua vez mediarão a destruição do periodonto iniciada pelas endotoxinas bacterianas.

Lindhe et al. (1973), associaram a presença de placa bacteriana e os mecanismos de defesa do hospedeiro com a destruição dos tecidos de sustentação dos dentes, ao realizarem um estudo em 20 cães da raça Beagle que foram alimentados com o mesmo tipo de dieta. Estes foram divididos em dois grupos: controle, cujos dentes inferiores esquerdos foram limpos duas vezes ao dia e experimental, nos quais os referidos dentes não foram limpos. Os cães foram examinados no início e após 7, 14, 21 e 28 dias e 2, 4, 6, 8, 12 e 18 meses. Observou-se a rápida formação da placa bacteriana nos dentes do grupo experimental, enquanto no grupo controle a presença de placa foi observada ocasionalmente. A íntima relação entre o acúmulo de placa bacteriana, exsudato gengival e migração de leucócitos creviculares durante as três primeiras semanas nos dentes do grupo experimental sugeriu a presença de fatores dentro da placa

bacteriana capazes de induzir as alterações inflamatórias. Além disso, nesse grupo, observou-se aumento na profundidade de sondagem e reduzida densidade óssea em áreas interproximais de alguns dentes após 18 meses. No grupo controle, não se observaram significantes alterações no índice gengival, no número de leucócitos creviculares, na profundidade de sondagem e nem perda de inserção.

Slots (1977) demonstrou que a microbiota obtida em lesões de indivíduos com periodontite do adulto era diferente da encontrada em sítios saudáveis e também em lesões de indivíduos com periodontite juvenil localizada.

Para Socransky (1977), existiam evidências suficientes de que as bactérias desempenhavam uma função primária na etiologia da doença periodontal; entretanto, os microrganismos específicos relacionados com as diferentes formas da doença deveriam ser identificados e a microbiota das áreas afetadas controlada, eliminando-se as bactérias patogênicas, antes do início da destruição dos tecidos periodontais.

Lindhe et al. (1980), realizaram um estudo em 22 pacientes com idades entre 21 e 28 anos, nos quais seis áreas do periodonto foram selecionadas e divididas de acordo com os sinais clínicos, para avaliar a microbiota de bolsas periodontais e as características histopatológicas dos tecidos vizinhos a áreas saudáveis e com doença. Através da análise bacteriológica verificaram que as proporções de bactérias nas amostras foram bastante distintas entre as várias categorias clínicas, sendo que nas áreas saudáveis haviam poucos microrganismos, dos quais cocos e bastonetes predominavam, enquanto que na presença da doença avançada, era comum um grande número de espiroquetas. Nos locais com gengivite, encontraram-se principalmente cocos, bastonetes, filamentos e fusiformes. Observaram um aumento na complexidade da microbiota com o aumento da

severidade da doença e, através de biópsia, verificaram que a composição celular do infiltrado inflamatório do tecido conjuntivo estava de alguma maneira correlacionada com a composição da população bacteriana.

Slots & Genco (1984) ressaltaram a função dos produtos do metabolismo de bactérias específicas, e dentre as bactérias periodontopatogênicas, o *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e a *Bacteroides gingivalis*, apresentavam mais virulência por estarem associadas às áreas de maior destruição periodontal. Também ressaltaram que as bactérias poderiam invadir os tecidos periodontais subepiteliais pelo menos nas formas mais severas de periodontite.

Para Slots & Dahlé (1985), *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* seriam importantes periodontopatógenos, sendo que os fatores de virulência dos dois primeiros poderiam envolver principalmente enzimas com o potencial de interferir com as defesas do hospedeiro e de promover destruição dos tecidos periodontais. O *Actinobacillus actinomycetemcomitans* agiria pela produção de toxinas que atuariam contra as células de defesa do hospedeiro, estando mais associado a periodontites avançadas em indivíduos jovens. Foi ressaltado que *Bacteroides gingivalis* e *Bacteroides intermedius* seriam importantes microrganismos envolvidos nos casos de periodontite do adulto.

Segundo Page (1986), a etiologia da doença periodontal crônica depende de microrganismos, sendo predominantes nas bolsas periodontais os Gram negativos, anaeróbios e móveis, principalmente *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius*, *Fusobacterium nucleatum* e *Eikenella corrodens*. Além disso, fatores ambientais locais deveriam ser levados em consideração na etiologia da doença

periodontal, por aumentarem a retenção e acúmulo de placa bacteriana e a resposta do hospedeiro frente a esses microrganismos.

Para Maiden et al. (1990), a destruição periodontal resultaria de um desequilíbrio na imunidade e de uma resposta não específica à microbiota desse indivíduo. Acreditavam que a etiologia da doença periodontal estaria relacionada com uma microbiota específica, porém, ainda não era possível separar as mudanças dessa microbiota dentro das causas e efeitos de uma fase particular da doença periodontal. Eles também sugeriram que indivíduos com alto risco de desenvolver a doença pudessem ser identificados por diferenças na microbiota subgengival quando comparados com indivíduos de baixo risco.

Para Marsh (1991), a formação da placa bacteriana seria um processo dinâmico, assim sua deposição, crescimento e remoção seria um processo contínuo e sua estrutura seria submetida à constante reorganização. Também salientou que a maioria das espécies bacterianas presentes na placa seria facultativa ou aneróbios estritos. Uma pobre higiene bucal poderia resultar em acentuado acúmulo de placa no sulco gengival, promovendo uma resposta inflamatória do hospedeiro e um aumento no fluxo do fluido gengival que contém tanto componentes de defesa do hospedeiro como peptídeos, glicoproteínas e proteínas que poderiam servir como nutrientes para as bactérias. Esta mudança no padrão de nutrientes poderia favorecer o crescimento de microrganismos obrigatoriamente anaeróbios, bactérias Gram negativas como, por exemplo, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Treponemas ssp*, que estão relacionados com a doença periodontal.

Socransky & Haffajee (1992) observaram inúmeros trabalhos na literatura relacionando certas bactérias subgengivais com a destruição do periodonto, tais como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella*

*intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus intermedius* e espiroquetas. Também salientaram que esses microrganismos eram encontrados em maior número e frequência em áreas ativas da doença quando comparados com áreas inativas.

Kojima et al. (1993), avaliaram o papel da *Porphyromonas gingivalis* na patogenia da doença periodontal, através da análise da placa subgingival de quatro sítios de todos os dentes remanescentes de 12 pacientes com periodontite do adulto. A amostra de placa foi avaliada através do uso de uma sonda de DNA para *P. gingivalis* e a quantidade dessa bactéria foi estatisticamente comparada com a profundidade de sondagem e sangramento à sondagem em cada paciente. Constatou-se que o patógeno representava 35% de todas as amostras, sendo que nos locais com profundidade de sondagem menor que três milímetros a detecção de *P. gingivalis* foi extremamente baixa e quando a profundidade de sondagem foi maior que quatro milímetros ou quando havia sangramento durante a sondagem a porcentagem de detecção aumentou significativamente. Entretanto, essa bactéria fora também detectada em sítios clinicamente saudáveis e não fora detectada em sítios doentes em alguns pacientes, indicando que *P. gingivalis* apresentava um papel importante, mas não era o único responsável pela periodontite do adulto.

Socransky & Haffajee (1994) advogaram que a presença de patógenos periodontais seria necessária, mas não o suficiente para que ocorra a doença, pois outros fatores como a susceptibilidade do hospedeiro, a interação entre espécies de microrganismos e o ambiente da bolsa, seriam importantes para facilitar a progressão da doença e a expressão de propriedades virulentas das bactérias.

Page (1998) salientou a presença do biofilme dentário e da resposta do hospedeiro na etiologia das doenças periodontais. As bactérias presentes no biofilme e seus produtos iniciariam o processo de destruição de tecidos gengivais e do ligamento periodontal e em conseqüência causariam reabsorção do osso alveolar. O biofilme conteria numerosos microambientes que variam em pH, tensão de oxigênio e disponibilidade de nutrientes específicos e apresentaria resistência às respostas do hospedeiro, uma vez que neutrófilos não conseguiriam agir efetivamente em um agregado com mais de cinco espécies bacterianas. As bactérias se comunicariam umas com as outras e construiriam uma estrutura complexa com um sistema circulatório primitivo. O fluido gengival contendo complemento e anticorpos, e todos os outros sistemas presentes no sangue para prevenir e controlar a infecção, fluiriam através da bolsa periodontal continuamente banhando o biofilme. As bactérias seriam em parte protegidas contra a ação de antibióticos administrados local e sistemicamente. Leucócitos, especialmente neutrófilos, se acumulariam na superfície do biofilme. Mesmo assim, as bactérias sobreviveriam e multiplicariam. Bactérias Gram negativas presentes liberariam o lipopolissacarídeo (LPS) que ao ganhar acesso ao tecido conjuntivo e vasos sangüíneos através do tecido epitelial acentuariam ainda mais o processo inflamatório.

Para Socransky et al. (1999), ao enfatizarem a importância do biofilme dentário na etiologia e tratamento das doenças periodontais, o biofilme promoveria inúmeras vantagens para a colonização das espécies bacterianas, uma vez que nutrientes são encontrados em níveis mais elevados em superfícies do que em solução. Os microrganismos que vivem em biofilme seriam mais resistentes a antibióticos do que organismos que vivem na forma planctônica (células livres). A

presença de canais possibilitaria a passagem de nutrientes e outras substâncias para os microrganismos localizados nas camadas mais profundas do biofilme, o que possibilitaria sua proliferação nas camadas adjacentes às superfícies sólidas. Além disso, a matriz glicoprotéica do biofilme poderia atuar como uma barreira protegendo contra a ação de antibióticos.

A presença de *Treponema socranskii*, *Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivalis* foi associada com doença periodontal por Takeuchi et al. (2001) em um estudo realizado em 123 pacientes, sendo 38 com periodontite agressiva, 65 com periodontite crônica e 20 indivíduos saudáveis. Foram avaliadas amostras de saliva e da placa subgengival e os microrganismos foram identificados pela reação de polimerização em cadeia (PCR, do inglês Polymerase Chain Reaction). Parâmetros clínicos foram relacionados com a presença desses microrganismos e observou-se que a detecção de *T. socranskii* foi de 71.1%, 89.2% e 30% em amostras de placa subgengival de pacientes com periodontite agressiva, pacientes com periodontite crônica e indivíduos saudáveis, respectivamente. O *T. denticola* foi detectado em 73.7%, 93.8% e 5% das amostras de placa subgengival de pacientes com periodontite agressiva, pacientes com periodontite crônica e indivíduos saudáveis, respectivamente. A *P. gingivalis* foi encontrada em 84.2%, 95.3% e 10% das amostras de placa subgengival de pacientes com periodontite agressiva, pacientes com periodontite crônica e indivíduos saudáveis, respectivamente. Esses três microrganismos foram detectados freqüentemente em sítios com profundidade de sondagem elevada, perda de inserção avançada e sangramento a sondagem nos pacientes com periodontite agressiva e naqueles com periodontite crônica. O *T. denticola* foi freqüentemente detectado com o *P. gingivalis* em amostras de placa subgengival, mostrando alto índice em pacientes com

periodontite crônica e periodontite agressiva. Co-infecções de *T. denticola*/ *P. gingivalis*, *T. socranskii*/ *P. gingivalis*, *T. socranskii*/ *T. denticola*, foram freqüentemente encontradas em bolsas com profundidade de sondagem maior ou igual a sete milímetros em pacientes com periodontite agressiva. Também foi observado que o *T. denticola* e *P. gingivalis* mostraram uma detecção semelhante tanto nas amostras de saliva como nas amostras de placa bacteriana, entretanto, a detecção do *T. socranskii* foi mais baixa nas amostras de saliva do que nas amostras de placa subgengival.

No mesmo ano, Hamlet et al. (2001) mostraram relação entre o *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* e profundidade de sondagem em 504 indivíduos australianos. Os microrganismos foram detectados em amostra de placa subgengival através do teste ELISA. O total de 6030 amostras de placa subgengival foi analisada, sendo que 40% dos pacientes apresentaram pelo menos um dos três microrganismos. O *A. actinomycetemcomitans*, a *P. gingivalis* e a *P. intermedia* foram detectados em 23%, 15% e 10% dos pacientes, respectivamente. A prevalência de *A. actinomycetemcomitans* diminuiu com o aumento da profundidade de sondagem, embora isso não tenha sido estatisticamente significativo. A prevalência de *P. gingivalis* foi fortemente associada a bolsas profundas. Não houve diferenças na prevalência da *P. intermedia* entre sítios com baixa profundidade de sondagem e sítios com profundidade de sondagem intermediária, sendo que esta bactéria não foi detectada em sítios com profundidade de sondagem maior ou igual a cinco milímetros.

Em 2004, Haffajee et al. realizaram uma investigação para examinar a composição da microbiota subgengival de indivíduos com periodontite crônica de quatro países. No Brasil, 58 indivíduos foram selecionados através de um exame

inicial que incluía a coleta dos seguintes dados: índice de placa, gengivite, sangramento à sondagem, supuração, profundidade de sondagem e nível de inserção em seis sítios por dente. As amostras de biofilme subgengival foram coletadas da superfície mesial de cada dente e analisadas quanto a presença de 40 espécies bacterianas através da técnica checkerboard DNA-DNA hibridização. *P. gingivalis* compreendeu 7.5% da microbiota dos brasileiros, enquanto *T. denticola* e *P. intermedia* compreenderam 6.7% e 6.5%, respectivamente.

### **2.1.1 Patógenos periodontais**

#### **2.1.1.1 *Streptococcus sanguinis***

O grupo heterogêneo de estreptococos orais que inclui o *Streptococcus sanguinis* pertence à população indígena da microbiota. *S. sanguinis* é reconhecido não apenas por sua associação com a endocardite bacteriana mas também por seu papel putativo antagonista na cárie dentária e doença periodontal (Caufield et al., 2000). Isolados dessa espécie são cocos Gram positivos e facultativos, presentes em altas proporções na placa supragengival de indivíduos com periodonto saudável, sendo assim associados à saúde periodontal (Socransky, Haffajee, 2005). Pertencem ao complexo amarelo na classificação do ecossistema subgengival (Socransky et al., 1998).

#### **2.1.1.2 *Porphyromonas gingivalis***

Isolados dessa espécie são bacilos anaeróbios, não-móveis, assacarolíticos, Gram negativos, que geralmente exibem morfologia de cocos ou bastonetes pequenos. O *P. gingivalis* é um membro do grupo muito investigado

“*Bacteroides* produtores de pigmentos negros”. Os microrganismos desse grupo formam colônias de pigmento castanho a negro em placas de agar sangue (Haffajee, Socransky, 1994). Pertencem ao complexo vermelho na classificação do ecossistema subgingival (Socransky et al., 1998).

O interesse inicial no *P. gingivalis* surgiu primeiramente devido ao papel essencial dessas espécies em certas infecções mistas experimentais e pela sua produção de uma diversidade de fatores de virulência. Membros dessa espécie produzem colagenase, uma série de proteases (incluindo aquelas capazes de destruir imunoglobulinas), hemolisinas, endotoxinas, ácidos graxos, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S, indol, etc (Haffajee, Socransky, 1994).

Estudos iniciados no final da década de 1970 até a data atual enfatizaram a associação do *P. gingivalis* com a doença e demonstraram que a espécie era incomum ou estava presente em números mínimos na saúde ou na gengivite, sendo mais freqüentemente encontrada nas formas destrutivas da doença. Essa espécie também tem se mostrado presente em números elevados e/ou freqüência de detecção em sítios de deterioração periodontal ou em indivíduos exibindo progressão da doença periodontal. A espécie apresenta-se diminuída em sítios tratados mas é comumente encontrada em sítios que exibem doença recorrente ou persistência de bolsas periodontais profundas após terapia. O *P. gingivalis* tem sido associado a um risco aumentado de gravidade e progressão da doença periodontal (Haffajee, Socransky, 1994).

O *P. gingivalis* tem se mostrado capaz de induzir elevadas respostas imunes sistêmicas e locais em indivíduos com variadas formas de periodontite. De fato, existe um esforço reconhecidamente intenso em muitos laboratórios nos últimos anos não somente para comparar o nível das respostas imunes em indivíduos com e

sem doença mas para examinar a avidéz relativa dos anticorpos, a subclasse dos anticorpos, o efeito do tratamento e a natureza dos antígenos que causam as respostas elevadas. Devem-se ressaltar nesse sentido as observações de Ogawa et al. (1989), as quais indicam uma média de aproximadamente 5% de plasmócitos em lesões de periodontite avançada formando anticorpos contra as fímbrias do *P. gingivalis*. O consenso entre os estudos de anticorpos é que muitos, mas não todos, os indivíduos que já sofreram perda de inserção periodontal exibem níveis elevados de anticorpos para antígenos de *P. gingivalis*, sugerindo que essa espécie ganhou acesso aos tecidos subjacentes e pode ter iniciado ou contribuído para a patologia observada.

#### 2.1.1.3 *Prevotella intermedia*

O *P. intermedia* é o segundo *Bacteroides* que se pigmenta de negro a atrair considerável interesse. Os níveis desse bastonete arredondado, anaeróbio, Gram negativo têm demonstrado ser particularmente elevados na gengivite ulcerativa necrosante, em certas formas de periodontite e em sítios progressivos de periodontites crônicas, e tem sido detectado por métodos imunohistológicos nos espaços intercelulares de biópsias de bolsas periodontais de indivíduos com periodontite de progressão rápida (Haffajee, Socransky, 1994). Pertencem ao complexo laranja na classificação do ecossistema subgengival (Socransky et al., 1998).

Essa espécie parece apresentar diversas propriedades virulentas exibidas pelo *P. gingivalis*. Mostrou-se capaz de invadir células epiteliais orais *in vitro*

e foram observados elevados níveis de anticorpos séricos em alguns, mas não em todos os indivíduos com periodontite refratária (Haffajee, Socransky, 1994).

#### 2.1.1.4 *Treponema denticola*

O *T. denticola* é uma espiroqueta altamente móvel, Gram negativa, anaeróbia, helicoidal e é encontrada com maior freqüência em sítios com doença periodontal que em sítios saudáveis, e na placa subgengival do que supragengival. Estudos por cultura sugeriram que o *T. denticola* e um “grande treponema” foram encontrados mais freqüentemente em pacientes com periodontite severa do que em sítios saudáveis ou com gengivite (Haffajee, Socransky, 1994). Pertencem ao complexo vermelho na classificação do ecossistema subgengival (Socransky et al., 1998).

## 2.2 Células dendríticas

As células dendríticas são células apresentadoras de antígenos com a habilidade única de induzir a resposta imune primária. As DCs capturam e transferem informação do ambiente externo para as células do sistema imune adaptativo. DCs não são necessárias apenas para a indução da resposta imune primária, mas também podem ser importantes para a indução da tolerância imunológica, tanto quanto para a regulação do tipo de resposta imune mediada por células T (Banchereau et al., 2000). Embora o entendimento sobre a biologia das células dendríticas ainda esteja na sua infância, já iniciaram-se as aplicações de protocolos de imunoterapia com DCs para obter-se imunidade contra câncer (Barbuto et al., 2004) e doenças infecciosas.

As primeiras DCs foram observadas por Paul Langerhans em 1868 na camada basal da epiderme (Ueno et al., 2007). Estas “Células de Langerhans” apresentavam uma morfologia “dendrítica” com longos e ramificados prolongamentos interpostos entre as células epiteliais. Esta morfologia peculiar levou Paul Langerhans a considerar esse tipo celular como um neurônio.

A caracterização das células dendríticas iniciou-se em 1973, quando Steinman & Cohn identificaram um novo tipo celular nas populações de células aderentes preparadas de órgãos linfóides periféricos de camundongos. Embora presentes em pequeno número (0.1 a 1.6% do total de células nucleadas), essas células apresentavam características morfológicas e funcionais que as diferenciavam das outras células presentes nesses órgãos: um grande núcleo, refratário, deformado e contendo pequenos nucléolos (normalmente dois). O abundante citoplasma estava arranjado em processos que variavam no tamanho e largura e continham grandes mitocôndrias. O termo “célula dendrítica” foi proposto para esse novo tipo celular.

A primeira descrição das propriedades funcionais das células dendríticas foi feita por Steinman et al. (1979). Os autores demonstraram que a capacidade de células esplênicas induzirem a proliferação de linfócitos alogênicos em uma cultura leucocitária mista era dada principalmente pelas DCs contidas nesse órgão. Além disso, foi demonstrado que células dendríticas purificadas eram capazes de, sozinhas, estimular a proliferação de células T alogênicas de maneira muito mais potente do que outras populações celulares presentes no baço.

### **2.2.1 Origem e heterogeneidade das subpopulações de células dendríticas**

A literatura acerca das DCs sugere que esta população parece estar dividida em diferentes subpopulações, tanto em humanos quanto em camundongos (Ardavín et al., 2001; Shortman, Liu, 2002). A distinção entre as diferentes subpopulações de DCs é mais evidente em camundongos do que em humanos, devido à acessibilidade aos diferentes tecidos. Entretanto, devido ao fato do presente estudo investigar as DCs humanas, foi limitada uma descrição mais detalhada dessas células em humanos.

A heterogeneidade das DCs nos humanos é refletida em quatro níveis. (a) Populações precursoras. Pelo menos dois subtipos de precursores de DCs circulam no sangue: monócitos CD14<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> e os precursores linhagem negativa (LIN<sup>neg</sup>) CD11c<sup>-</sup> IL-3R $\alpha$ <sup>+</sup>. (b) Localização anatômica. O nível de heterogeneidade refletido pela localização anatômica inclui células de Langerhans da epiderme, DCs dérmicas (intersticiais), DCs esplênicas marginais, células interdigitantes das regiões de células T, DCs centro-germinais, DCs tímicas, DCs do fígado, e DCs sangüíneas. (c) Função. Ambas DCs murinas e humanas exercem funções diferentes, particularmente na regulação da proliferação de células B e diferenciação de células T nos tipos 1 e 2. (d) Resultado final da resposta imune. Refere-se à indução de tolerância ou imunidade (Banchereau et al., 2000).

No entanto, a maioria dos estudos a respeito de subpopulações de DCs e sua origem não vêm do isolamento direto dos tecidos, mas sim do desenvolvimento de precursores em cultura. Monócitos do sangue periférico, bem como precursores hematopoiéticos CD34<sup>+</sup> são dois tipos celulares que, recebendo estímulos apropriados, podem se diferenciar *in vitro* em DCs. Há indícios de que *in vivo*, no tecido, os monócitos, recém egressos do sangue, também tenham o potencial de se

diferenciar tanto em macrófagos quanto em DCs, dependendo dos fatores encontrados no ambiente durante sua migração do sangue para os tecidos periféricos (Sallusto, Lanzavecchia, 1994).

Em 1996, Caux et al. demonstraram que células dendríticas podiam ser geradas a partir de precursores mielóides humanos CD34+ cultivados em presença do fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) por 12 dias. Dois subtipos de DCs foram observados: as células de Langerhans, caracterizadas pela expressão de CD1a, Lag, grânulos de Birbeck e E-caderina; e as DCs CD14-derivadas, caracterizadas pela expressão de CD1a, CD2, CD9, CD68 e fator XIIIa.

No mesmo ano, Zhou & Tedder (1996) relataram a obtenção de DCs através do cultivo de monócitos sangüíneos (CD14+ CD1a-) em meio contendo GM-CSF, IL-4 e TNF- $\alpha$  por 7 dias. Os monócitos diferenciaram-se em DCs CD1a+ CD83+. Essas células apresentaram todas as características fenotípicas e morfológicas de DCs maduras. A adição de TNF- $\alpha$  ao meio de cultura aumentou a capacidade das células dendríticas em estimular linfócitos T naive alogênicos e diminuiu a capacidade de processamento do antígeno.

Ainda em 1996, Romani et al. reportaram um método de obtenção de DCs através do cultivo de precursores hematopoiéticos CD34- em meio contendo GM-CSF e IL-4 por 7 dias. Entretanto, as células geradas foram caracterizadas como DCs maduras instáveis, pois perdiam suas características morfológicas e de não-aderência quando as citocinas eram removidas. Para a completa maturação e estabilidade das DCs, os autores relataram a necessidade de mais 3 dias de cultura na presença de um meio condicionado com fatores de maturação. Com o método

apresentado, 40 mL de sangue renderam  $0.8-3.3 \times 10^6$  DCs maduras, definidas pela expressão da molécula CD83.

Em 1998, Palucka et al. advogaram que os monócitos sangüíneos possuíam um duplo potencial de diferenciação dependente das citocinas presentes no meio. Assim, PBMC enriquecido de monócitos ( $> 80\%$  CD14<sup>+</sup> CD68<sup>+</sup> MPO<sup>low</sup>) cultivado com M-CSF ou GM-CSF/IL-4 diferenciaram-se em macrófagos (CD14<sup>high</sup> CD1a<sup>-</sup> CD68<sup>+</sup> MPO<sup>-</sup>) ou MDDCs (do inglês, Monocyte-derived Dendritic Cells) (CD14<sup>low/-</sup> CD1a<sup>high</sup> CD68<sup>+</sup> MPO<sup>-</sup>), respectivamente.

Uma outra via de desenvolvimento a partir de monócitos resulta na geração das chamadas células dendríticas plasmocitóides. Em 1997, Grouard et al. demonstraram que células CD4<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup> CD3<sup>-</sup> correspondiam às células T plasmocitóides e, em cultura, entravam rapidamente em apoptose na ausência de IL-3. A adição do CD40-ligante induzia a diferenciação dessas células em DCs que expressavam baixos níveis dos antígenos mielóides CD13 e CD33.

No mesmo ano, Olweus et al. (1997) identificaram nas áreas de células T dos órgãos linfóides humanos, um subtipo de DCs não ativadas e pertencentes a uma linhagem separada que pôde ser definida pelos altos níveis da cadeia alfa do receptor de IL-3 (IL-3R $\alpha$ <sup>high</sup>). Mostraram também que seus progenitores eram mielóides (CD34<sup>+</sup> IL-3R $\alpha$ <sup>high</sup>) e distintos dos que originavam as células de Langerhans *in vitro*. Além disso, os autores relataram que as DCs IL-3R $\alpha$ <sup>high</sup> pareciam migrar para os órgãos linfóides independente de estímulos inflamatórios ou invasão de antígenos.

Finalmente, um outro subtipo de DC pode ser gerado em cultura pela adição do fator de crescimento transformador (TGF)- $\beta$  ou da IL-15 juntamente com o

GM-CSF aos monócitos, o que induz a diferenciação dos mesmos em células de Langerhans (Geissmann et al., 1998). Essas células são caracterizadas pela expressão de CD1a e uma lectina conhecida como langerina em sua superfície, além de possuírem em seu interior, elementos elétron-densos denominados grânulos de Birbeck.

### ***2.2.2 Captura de antígenos pelas células dendríticas***

As DCs estão presentes na maioria dos tecidos em fase de diferenciação chamada "imatura". As DCs imaturas (do inglês immature DCs - imDCs) são caracterizadas por intensa atividade endocítica e podem capturar vários tipos de antígenos como: patógenos, células infectadas, células mortas e seus produtos. As imDCs poderiam ter uma função de tolerância periférica de células CD4+ e CD8+, induzindo a deleção, a anergia ou a regulação de determinados clones. As imDCs também capturam antígenos continuamente e migram para os linfonodos participando na apresentação aos linfócitos T, apesar das imDCs expressarem baixos níveis de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e de moléculas co-estimulatórias (Steinman, Nussenzweig, 2002).

Uma vez endocitados, antígenos se ligam às moléculas de MHC, levando ao início do processo de maturação das DCs, transformando-as assim em células próprias para apresentação dos antígenos fagocitados às células T. Essas características associadas à sua localização em todo organismo e em tecidos periféricos fazem das DCs as células sentinelas que monitoram o ambiente à procura de patógenos invasores (Cella et al., 1997).

A captura de antígenos pelas DCs ocorre por diferentes vias: fagocitose, macropinocitose e endocitose via receptores de superfície. As DCs seqüestram em geral partículas e microrganismos, porém os últimos também podem ser capturados por endocitose via receptores (Banchereau, Steinman, 1998).

As células dendríticas podem diferenciar patógenos através do reconhecimento de seus padrões moleculares. Dentre vários receptores de reconhecimento destacam-se os receptores do tipo Toll (do inglês Toll-like receptors - TLRs). Esses receptores possuem função primordial de reconhecer os padrões moleculares e quando ativados, desencadeiam as vias de sinalização intracelular que auxiliam na resposta a ser seguida mediante ao microrganismo reconhecido. Foram descritas as expressões de TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 e TLR9 em DCs (van Kooyk, Geijtenbeek, 2003). Dentre outras moléculas, esses receptores reconhecem lipoproteínas de procaríotos, glicolipídeos, flagelina, CpG DNA e lipopolissacarídeos (Janeway Junior, Medzhitov, 2002).

As lecitinas do tipo C também são encontradas nas DCs, como a langerina (CD207), o receptor de manose (CD206), o receptor de manose para macrófago DEC-205 (CD205) e o receptor DC-SIGN. Esses receptores reconhecem carboidratos na superfície dos patógenos e também medeiam a endocitose (Engering et al., 2002).

Os antígenos capturados devem entrar nas vias exógenas ou endógenas de processamento e apresentação através de moléculas de MHC. A apresentação pela via exógena é realizada pelas moléculas MHC tipo II. O produto da endocitose é alojado em endossomos e é parcialmente hidrolisado até a fusão com vesículas ricas em moléculas de MHC tipo II chamadas MIIC. Esses endossomos especiais possuem além das moléculas de MHC tipo II, uma série de proteases de cisteína e

hidrolases que fragmentam os antígenos para apresentação. O pH levemente ácido do endossomo auxilia no desacoplamento das moléculas antigênicas de seus receptores endocíticos, sendo estes reciclados posteriormente para a membrana plasmática. Fragmentados, os antígenos se ligam às moléculas MHC, são exocitados e expressos na membrana plasmática para reconhecimento pelas células T CD4+ (Lipscomb, Masten, 2002).

### ***2.2.3 Maturação e migração das células dendríticas***

Sendo realizada a função de captura e patrulhamento dos tecidos do corpo, ou seja, uma vez reconhecido o “perigo”, as DCs devem apresentar os antígenos para as células T e B objetivando iniciar as respostas celulares e humorais. Primeiramente é necessário que ocorra um fenômeno identificado por maturação. As imDCs apresentam baixa expressão de moléculas do MHC II e das moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 e CD40. Quando neste estado de ativação, as DCs são pobres estimuladoras de respostas de células T. Quando componentes derivados de patógenos ou sinais inflamatórios estão presentes, as células dendríticas sofrem mudanças funcionais e fenotípicas. As DCs são então ditas células dendríticas maduras e tornam-se capazes de estimular respostas de células T (Guermonprez et al., 2002). Quando maduras as DCs diminuem sua capacidade de capturar antígenos e migram para os linfonodos. Durante o processo de maturação a expressão do receptor de quimiocina CCR6 diminui, ao passo que a expressão do receptor CCR7 aumenta. A quimiocina MIP-3 $\beta$ , ligando-se ao CCR7, guia a migração das DCs maduras para os linfonodos e sua fixação nas áreas de células T (Dieu et al., 1998). Dessa forma, o processo de maturação das células dendríticas integra-se ao processo de migração das mesmas em direção às áreas T

dos linfonodos, fazendo com que a probabilidade do encontro com um linfócito T antígeno-específico aumente.

A expressão relativa das moléculas CD80 e CD86 nas células dendríticas determinam o tipo de resposta ( $T_H1$  ou  $T_H2$ , respectivamente), visto que CD80 e CD86 não transmitem sinais co-estimuladores idênticos. CD86 preferencialmente co-estimula a produção inicial da citocina- $T_H2$  IL-4. A interação com CD28 instrui células T naive a produzir elevados níveis de citocinas  $T_H2$ . Na maioria das APCs, CD86 é expressa constitutivamente em baixos níveis e é rapidamente elevada, enquanto a expressão de CD80 é induzida tardiamente após a ativação, implicando na maior importância da molécula CD86 como fator co-estimulador para a iniciação da resposta imune (Cutler, Jotwani, 2004).

#### **2.2.4 Células dendríticas e patógenos**

As células dendríticas atuam como sentinelas identificando o perigo representado tanto por um dano tecidual quanto por uma invasão microbiana. Produtos microbianos como o LPS ou CpG DNA podem ativar os mecanismos da resposta imune inata, incluindo DCs, gerando respostas benéficas para o hospedeiro.

O lipopolissacarídeo da parede celular das bactérias Gram negativas é a principal molécula reconhecida pelo sistema imune inato. O LPS atua por meio do TLR4 associado ao CD14, os quais ativam o fator de transcrição NF $\kappa$ B. Sinalização por essa via induz a expressão de moléculas co-estimuladoras e citocinas, tais como TNF- $\alpha$  e IL-1, que estimulam a migração de células dendríticas tissulares.

Após a exposição ao LPS ou outros produtos bacterianos, *in vitro* ou *in vivo*, as DCs tornam-se ativadas e iniciam o processo de maturação. *In vitro*, a maturação das DCs envolve duas rotas de sinalização: a) ERK quinase, que permite a sobrevivência da célula dendrítica, e b) NFκB, que permite a maturação caracterizada pelo aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras e moléculas MHC II, reação a quimiocinas e migração. Esses processos coordenados induzem tanto uma alta capacidade de estimular células T quanto produzir IL-12, resultando no desenvolvimento da resposta imune protetora (Rescigno et al., 1998).

Entretanto, alguns patógenos têm desenvolvido múltiplas estratégias para escapar ou resistir à resposta imune alterando algumas etapas da resposta, incluindo a inibição da maturação e função das células dendríticas, interferência no processamento/apresentação através do MHC II, e hiperativação das células T (superantígenos bacterianos) como exemplos.

Stenger et al., em 1998, demonstraram que a diminuição da expressão de CD1 em APCs CD1<sup>+</sup> apenas ocorreu em células infectadas com *Mycobacterium tuberculosis* viva. A bactéria morta pelo calor não afetou a expressão de CD1, indicando que a regulação da expressão dessa proteína depende de interações específicas entre a *M. Tuberculosis* viva e a maquinaria da célula hospedeira.

Em 1999, van Overtvelt et al. relataram que o protozoário *Trypanosoma cruzi* foi capaz de invadir MDDCs e se multiplicar intracelularmente. Interessantemente, essa infecção gerou conseqüências na maturação das DCs induzida por LPS. Primeiro, após a infecção com o *T. cruzi*, a síntese basal de IL-12 e TNF-α foi prejudicada. Segundo, tanto a secreção das citocinas IL-12, TNF-α e IL-6, que normalmente apresentava-se elevada nas células dendríticas estimuladas com LPS, como a expressão das moléculas HLA-DR e CD40 foram

significativamente reduzidas após a infecção com o parasita. Os autores também observaram que o meio onde o *T. cruzi* estava condicionado causou os mesmos efeitos nas MDDCs, indicando que os efeitos inibitórios foram mediados por fatores solúveis produzidos pelo *T. cruzi*.

Corinti et al. (1999) relataram que DCs incubadas por 18 horas com *Streptococcus gordonii* apresentaram aumento na expressão de MHC II e das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86. Além disso, CD40 e CD83 foram ambos super-regulados. Em contraste, a expressão de CD1a foi diminuída. Os efeitos do *S. gordonii* nas células dendríticas foram estritamente dose-dependentes e também puderam ser detectados quando bactéria morta pelo calor e LTA foram utilizados. *S. gordonii* e LTA também induziram a secreção de IL-10 e promoveram a produção substancial de IL-12. Em paralelo, *S. gordonii* aumentou consideravelmente a capacidade das DCs em ativar linfócitos T alogênicos.

### **2.2.5 Ativação de células T**

Alguns estudos propõem que as distintas subpopulações, tanto as isoladas de tecidos quanto as diferenciadas *in vitro*, ativariam respostas diferentes.

Inaba et al. (1983) demonstraram que a capacidade dos linfócitos B produzirem anticorpo anti-hemácias de carneiro, *in vitro*, era dependente da presença de células dendríticas na cultura. Linfócitos B cultivados em condições em que apenas linfócitos T e hemácias de carneiro estavam presentes não eram capazes de produzir anticorpos contra as hemácias. No entanto, a adição de números crescentes de células dendríticas às culturas restabeleceu a capacidade de produção de anticorpos pelos linfócitos B.

O mesmo grupo demonstrou posteriormente (Inaba et al., 1984) que as células dendríticas formavam aglomerados com linfócitos T naive e que a formação destes aglomerados estava ligada à capacidade única das DCs em estimular estes linfócitos.

Outros trabalhos envolvendo a capacidade das DCs em gerar respostas imunes efetivas foram realizados utilizando-se linfócitos T CD8 como células respondedoras. Inaba et al. (1987), utilizando como modelo experimental culturas leucocitárias mistas realizadas com subpopulações específicas de linfócitos T, demonstraram que DCs são capazes de formar aglomerados com linfócitos T CD8 de maneira semelhante aos formados entre DCs e os linfócitos T CD4. Os autores demonstraram também que os linfócitos T CD8 podiam ser ativados pelas DCs na ausência de ajuda provida pelos linfócitos T CD4.

A capacidade das DCs produzirem citocinas é um fator importante para sua habilidade ímpar de induzir a geração de imunidade adaptativa. As citocinas produzidas pelas DCs tornam-se parte do microambiente em que a resposta imune se desenvolve e podem alterá-la significativamente, sendo inclusive classificada por alguns autores como o “terceiro sinal” capaz de guiar o desenvolvimento das propriedades efetoras dos linfócitos T naive (Reis, 2006).

O tipo de citocina produzida inicialmente na resposta imune parece ser a chave para se determinar qual resposta imune,  $T_H1$  ou  $T_H2$ , será gerada. As células dendríticas possuem um importante papel na determinação do tipo de resposta imune uma vez que, através da produção de IL-12 pode-se preferencialmente direcionar o desenvolvimento de células  $T_H1$  *in vitro* e *in vivo* (Pulendran et al., 1999), ao passo que a ausência de produção pelas DCs de IL-12, na presença de IL-4 e/ ou IL-13 favoreceria uma resposta predominantemente mediada por linfócitos do

tipo  $T_H2$ . Em contrapartida, a produção de IL-10 pelas DCs pode favorecer o surgimento de linfócitos T reguladores ( $T_{reg}$ ), caracterizados pelo fator de transcrição Foxp3 e pela produção de citocinas imunossupressoras como TGF- $\beta$  e IL-10.

Algumas características das células  $T_{reg}$  as diferenciam das demais células T como, por exemplo, a baixa capacidade de proliferação frente a estímulos *in vitro* e a capacidade de suprimir respostas efectoras das células T CD4+ e T CD8+ (Suri-payer et al., 1998) através do contato celular.

O'Garra, ao fazer uma revisão da literatura em 1998, constatou que, embora citocinas específicas como IL-12, IFN $\gamma$  ou IL-4 sem dúvida polarizam as respostas  $T_H1$  e  $T_H2$ , outros estudos propuseram que as fortes interações mediadas pelos receptores de células T (TCR) e complexo MHC:peptídeo, a dose e/ou a natureza dos antígenos, a rota de entrada dos antígenos/microrganismos, tanto quanto o perfil genético do hospedeiro, também podem afetar diretamente o desenvolvimento dos subtipos de células T CD4+ a partir dos precursores naive. Além disso, a autora comentou que células  $T_{reg}$  podem, através da produção de TGF- $\beta$ , inibir o desenvolvimento das respostas  $T_H1$  e  $T_H2$ .

Kalinski et al., em 1999, mostraram que fatores como IL-10, TGF- $\beta$  e PGE<sub>2</sub>, podiam estimular DCs mielóides imaturas (CD1a+ CD83+) a induzir uma diferenciação  $T_H2$ .

No mesmo ano, Rissoan et al. (1999) mostraram que as DCs mielóides induziram uma produção de citocinas inflamatórias ( $T_H1$ ) e as DCs plasmocitóides promoveram uma resposta  $T_H2$ , *in vitro*.

Em 2000, Tanaka et al. mostraram que, em cultura, MDCCs são capazes de direcionar a diferenciação  $T_H2$  de células T naive humanas quando existe uma

baixa proporção entre DCs e células T (1:300) durante reações leucocitárias mistas primárias, demonstrando que o direcionamento para uma resposta  $T_H2$  não é exclusivo das DCs plasmocitóides. Quando a proporção é alta (1:4), uma resposta mista  $T_H1/ T_H2$  é favorecida.

Alguns estudos alertam para a importância da cinética para o desenvolvimento de DCs e mostram que células dendríticas recém ativadas produzem grandes quantidades de IL-12, mas perdem esta capacidade após um período de ativação e induzem uma resposta  $T_H2$  (Kalinski et al., 1999).

De acordo com Maldonado-Lopez (1999), a produção de IL-12 pelas células dendríticas requer a ativação primária dessas células e a quantidade de IL-12 depende do modo de ativação.

Células dendríticas capazes de produzir altas quantidades de IL-10 podem induzir a geração de linfócitos T produtores de IL-10 e com propriedades supressoras (Wakkach et al., 2003; Svensson et al., 2004).

Cong et al. (2005) demonstraram que células dendríticas impedidas de maturar-se são capazes de gerar células T reguladoras. No modelo apresentado, a geração de células  $T_{reg}$  é dependente da IL-10 produzida pelas DCs, porém seus efeitos supressores são dependentes de contato e independentes de IL-10 e TGF- $\beta$ .

Spörri & Reis (2005) demonstraram, de maneira muito elegante, que células dendríticas caracterizadas fenotipicamente como maduras, mas que não produzem IL-12, são capazes de induzir a proliferação de linfócitos T naive. Porém, os linfócitos estimulados são incapazes de realizar suas funções efetoras.

Considerando a importância dos padrões de citocinas produzidos frente a um estímulo na definição do padrão de resposta imune, e muitas vezes na indução e

manutenção de estados patológicos, estudos que abordem o papel das células dendríticas neste contexto são de potencial relevância clínica. Uma das situações nas quais este padrão de produção de citocinas parece ser muito significativa é a doença periodontal.

Apesar de intrinsecamente relacionadas com a geração de respostas imunes adaptativas, as células dendríticas possuem também um papel essencial na indução e manutenção de tolerância.

A presença de células dendríticas com capacidade de apresentação de antígeno no timo, observada em 1986 por Kyewski et al., sugeriu o envolvimento destas células nos processos de seleção dos linfócitos T.

Posteriormente, demonstrou-se que a expressão de antígenos especificamente por DCs no timo, era capaz de induzir a seleção negativa de timócitos em desenvolvimento (Brocker et al., 1997).

O papel das células dendríticas na indução de células T com capacidade supressora e seu papel na manutenção da tolerância periférica têm sido mostrada em diferentes modelos experimentais, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Células dendríticas tratadas com IL-10 perdem a capacidade de maturação e são capazes de induzir anergia em linfócitos T CD4 aloespecíficos (Steinbrink et al., 1997).

Inaba et al. (1998) descreveram como as DCs processam fragmentos celulares fagocitados resultando em produtos do complexo principal de histocompatibilidade de classe II com uma eficácia extraordinária. Porém, relataram que a ausência de estímulos para a maturação das células dendríticas induz tolerância periférica das células T.

Jonuleit et al. (2000) demonstraram que a estimulação repetida de linfócitos T com DCs alogênicas imaturas pode induzir a geração de linfócitos T com propriedades reguladoras, secretores de IL-10 e com baixa capacidade proliferativa.

Hawiger et al. (2001), com a intenção de examinar a função das DCs no estágio estacionário *in vivo*, desenvolveram *in situ* um peptídeo acoplado a um anticorpo dirigido contra a proteína de membrana DEC-205 das DCs. Um peptídeo livre associado a CFA (adjuvante completo de Freund) serviu como parâmetro de comparação. Os resultados mostraram que o DEC-205 aumentou a eficiência das DCs em induzir a ativação e divisão das células T em pelo menos 100-1000 vezes em relação ao adjuvante. Entretanto, as células T ativadas não foram polarizadas a produzir IFN $\gamma$  e a ativação da resposta não foi mantida. Após sete dias, o número de células T antígeno-específicas foi severamente reduzido e as células T residuais tornaram-se indiferentes ao desafio sistêmico com peptídeo associado a CFA. A coinjeção de DCs associadas ao peptídeo acoplado ao anticorpo e anti-CD40 alterou o estado de tolerância para uma prolongada ativação das células T e imunidade. Os autores concluíram que a ausência de estímulo adicional nas DCs induziu uma ativação transitória das células T antígeno-específicas seguida de uma deleção das células T e ausência de resposta.

Recentemente, foi demonstrado, de maneira surpreendente, que DCs presentes na periferia podem migrar para o timo e induzir a deleção de clones de linfócitos T em desenvolvimento reativos ao antígeno apresentado por essas DCs (Bonasio et al., 2006).

Os estudos citados acima demonstram que as DCs podem estar envolvidas na regulação da resposta imune alterando o comportamento das células T, seja deletando-as, tornando-as anérgicas ou grandes produtoras de IL-10.

### **2.3 Células dendríticas e periodontite**

Existe evidência que a proteção contra parasitas ou doenças infecciosas relaciona-se com o caráter da resposta imune, por exemplo, o balanço entre as respostas do tipo  $T_H1/T_H2$ . Em particular, células  $T_H1$  são importantes efetores envolvidos na erradicação de patógenos infecciosos intracelulares, enquanto linfócitos  $T_H2$  são eficientes em eliminar parasitas extracelulares. Relevantemente, o desenvolvimento de um inapropriado subtipo  $T_H$  não apenas falha em erradicar o patógeno mas pode causar uma imunopatologia (Maldonado-Lopez et al., 1999).

Ao fazer uma revisão de literatura em 1987, Seymour constatou que qualquer defeito ou desequilíbrio na resposta do hospedeiro frente à bactérias periodontopatogênicas poderia resultar em destruição tecidual como a observada na doença periodontal inflamatória crônica.

Em 2000, Séguier et al. demonstraram uma diminuição da quantidade de células de Langerhans CD1a+ de acordo com a severidade da doença periodontal estimada pelo número de linfócitos intraepiteliais e pela fração de área ocupada pelas fibras colágenas em biópsias gengivais.

A mesma equipe de pesquisadores (Séguier et al., 2000) publicaram em seguida um trabalho evidenciando importantes variações morfológicas nas células de Langerhans CD1a+ de acordo com a localização no epitélio e severidade da doença periodontal.

Os trabalhos citados acima associaram a resposta imune específica com a destruição periodontal mais severa. Entretanto, não se sabe exatamente o que dirige a resposta periodontal para esse padrão mais destrutivo.

As citocinas produzidas localmente no periodonto são consideradas fatores-chave na regulação da destruição periodontal. Em uma recente revisão da literatura, Gemmel et al. (2007) constataram que a maioria dos estudos concorda sobre a maior abundância das citocinas T<sub>H</sub>2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) do que T<sub>H</sub>1 (IL-2, IL-12, IFN $\gamma$  e TNF- $\beta$ ) na periodontite.

Há evidência de que as células T<sub>H</sub>1 são encontradas mais abundantemente na gengivite e as T<sub>H</sub>2 na periodontite (Yamazaki et al., 1995).

Yamamoto et al. (1997) relataram que embora o tecido gengival inflamado tenha apresentado ambos subtipos celulares T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2, a expressão predominante de citocinas T<sub>H</sub>2 poderia contribuir para a alta indução da resposta local de células B nos sítios com doença.

Sigusch et al., em 1998, demonstraram que células mononucleares do sangue periférico de pacientes com periodontite agressiva secretaram pouco IFN $\gamma$  e sofreram diminuição na expressão de mRNA de IFN $\gamma$  e IL-2 em resposta a mitógenos, indicando redução na resposta T<sub>H</sub>1, enquanto alta produção de IL-5 e GM-CSF foi observada nos pacientes com periodontite crônica, sugerindo aumento na resposta T<sub>H</sub>2.

Takeichi et al. (2000) relataram que as células gengivais mononucleares de pacientes com periodontite crônica expressaram maiores quantidades de IFN $\gamma$  e mRNA de IL-2, IL-4, IL-5 e IL-6, ao contrário de pacientes saudáveis.

Em 2001, Yun et al. investigando a atividade de proteases da *P. gingivalis*, demonstraram que essas enzimas degradam IL-12 reduzindo a produção de IFN $\gamma$  pelas células T CD4. Os autores concluíram que a inativação da IL-12 pelas *gingipains* poderia favorecer a resposta T<sub>H</sub>2 com progressão da doença.

Os mecanismos pelos quais determinados periodontopatógenos induzem um tipo destrutivo de resposta imune nas doenças periodontais não são conhecidos. *In vitro*, o estímulo com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Actinobacillus viscosus* promove uma super-regulação de CD86 e CD83 em DCs e a proliferação de linfócitos T co-cultivados com células dendríticas. É possível que os patógenos encontrados no periodonto possam induzir diferentes alterações funcionais das células dendríticas.

O estudo de Wassenaar et al. (1995) mostraram que clones de células T gerados de tecido gengival inflamado usando-se fitohemaglutinina (do inglês Phytohaemagglutinin - PHA) e IL-2 como estimulantes foram heterogêneos em relação à especificidade antigênica. Os antígenos que foram reconhecidos incluíam *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e colágeno tipo I.

Pulendran et al. (2001) evidenciaram que células dendríticas isoladas de baço de camundongos pulsadas por lipopolissacarídeo de *E. coli* induziram uma resposta T<sub>H</sub>1. Ao contrário, lipopolissacarídeo de *P. gingivalis* induziu pouca produção de IFN $\gamma$ , enquanto que IL-2 e citocinas T<sub>H</sub>2 (IL-5 e IL-10) foram detectadas em níveis significantes.

Jotwani et al. (2001) avaliaram as citocinas produzidas por células dendríticas co-cultivadas com linfócitos T, ambos isolados de células mononucleares sangüíneas periféricas. Previamente a co-cultura, as células dendríticas foram

pulsadas por lipopolissacarídeos de *P. gingivalis*. Além de induzir a maturação e a expressão de moléculas co-estimuladoras, *P. gingivalis* estimulou a produção das citocinas IL-10 e IL-12 pelas DCs. Interessantemente, a produção dessas citocinas pelas DCs tratadas com *P. gingivalis* foi três vezes maior do que a produção pelas DCs tratadas com *E. coli*. A menor proliferação dos linfócitos T CD4+ autólogos e a reduzida produção de IFN $\gamma$  estimuladas pelas DCs tratadas com *P. gingivalis* também foram observadas.

Berglundh et al. (2002) relataram a produção de baixos níveis de IL-12p70 pelas células do sangue periférico de pacientes com periodontite após estímulo com LPS de *Escherichia coli*, sugerindo um fenótipo promotor de resposta T<sub>H</sub>2 de APCs dos pacientes com periodontite. Esse fenótipo implica em características intrínsecas ou diferentes ativações dos monócitos, devido à alterações microambientais tissulares, por exemplo condições inflamatórias na doença periodontal. Além disso, esse fenótipo pode ser um importante fator de susceptibilidade para a doença.

Mahanonda et al. (2002) relataram uma super-expressão de CD83 nas células B dos tecidos de indivíduos com periodontite quando comparada à expressão em células B de indivíduos com periodonto saudável. *In vitro*, células B foram estimuladas por 24 horas com extratos de *Actinomyces viscosus*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *A. actinomycetemcomitans* nas concentrações de 0.016, 0.4 e 10 $\mu$ g/mL. A expressão de CD83 e CD86 aumentou de maneira dose-dependente, entretanto, a cinética da expressão foi diferente entre essas moléculas. Enquanto a expressão de CD83 foi detectada precocemente (três horas após o estímulo), atingiu o pico de expressão às seis horas e declinou até as 48 horas, a expressão de CD86 foi detectada somente 12 horas após o estímulo e manteve-se até as 48 horas do experimento. Também mostraram que células B tratadas com 10 $\mu$ g/mL de *P.*

*gingivalis* foram capazes de induzir a proliferação de células T alogênicas e estimularam a liberação de IFN $\gamma$  pelos linfócitos T, enquanto apenas mínimas quantidades de IL-5 foram liberadas.

Quando células dendríticas foram pulsadas com *P. gingivalis* e co-cultivadas com linfócitos T, esses linfócitos apresentaram maior proliferação do que quando foram pulsadas por *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* e *A. viscosus* (Aroonrerk et al., 2003). Embora estes dados sugiram um papel significativo para bactérias na definição do padrão de resposta de linfócitos T, o estudo não incluiu o estudo de citocinas importantes na reabsorção óssea periodontal, como TNF e IL-1, entre outras importantes na definição de uma resposta imune polarizada. Além disso, a produção de citocinas de células dendríticas somente foram estudadas para células dendríticas pulsadas por *P. gingivalis*.

Jotwani & Cutler (2004) demonstraram que a *P. gingivalis* com fímbrias, ao contrário do seu mutante fímbria-deficiente, induz a maturação da célula dendrítica, aumentando a expressão de moléculas co-estimuladoras e a secreção de citocinas inflamatórias - IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12 - além de induzir uma resposta T<sub>H</sub>1 com liberação de IFN $\gamma$ , e a secreção de IL-10 que apresenta efeitos imunossupressores.

Uma série de evidências sugere que a IL-10 é importante na periodontite. Lappin et al., em 2001, identificaram em biópsias gengivais de pacientes com doença periodontal um maior número de leucócitos expressando a proteína antiinflamatória IL-10, ao contrário das expressões das proteínas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$ .

As células dendríticas parecem estar envolvidas na manutenção das doenças periodontais inflamatórias.

Através de imunohistoquímica, a presença e distribuição de células dendríticas no periodonto têm sido estudada. O epitélio gengival parece ser um sítio de tráfego ativo de células de Langerhans, enquanto que a lâmina própria, na periodontite crônica, contém células dendríticas maduras CD83+ e células dendríticas dérmicas. Sugere-se que as células de Langerhans do epitélio, depois da exposição aos periodontopatógenos, dão origem às células dendríticas maduras do conjuntivo. Essa maturação das células de Langerhans em células dendríticas maduras parece ocorrer *in situ* (Cutler et al., 1999), mas também é possível que, após o contato com os patógenos periodontais, elas migrem para os linfonodos, onde amadurecem.

Especificamente, *P. gingivalis* sensibilizaram células de Langerhans, induzindo sua maturação e aumentando a expressão de moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86), CD40, CD83 e HLA (Cutler et al., 1999).

O processo de maturação das células dendríticas pode explicar o fato de as células de Langerhans CD1a+ estarem diminuídas na periodontite e gengivite em comparação com a gengiva normal (Séguier et al., 2000a), já que elas podem ter migrado para o conjuntivo após contato com patógenos.

Em 2001, Jotwani et al. advogaram que o fato de células dendríticas maduras CD83+ e células dendríticas dérmicas estarem aumentadas na lâmina própria nos casos de periodontite comparada ao periodonto saudável também seria justificado pelo processo de maturação das células dendríticas.

Cirrincione et al. (2002), no intuito de caracterizar as células dendríticas na periodontite crônica, analisaram biópsias de pacientes com a doença e verificaram que as células de Langerhans estavam espalhadas no epitélio oral, mas restritas à camada basal do epitélio da bolsa periodontal; essas células não expressavam grandes quantidades de moléculas do MHC II nem estavam em contato com linfócitos. Entretanto, DCs estavam abundantemente presentes na lâmina própria do epitélio da bolsa, além de expressarem MHC II, CD54, CD80 e CD86, e foram vistas em contato com linfócitos CD4+ e CD8+.

Também em 2002, Gemmel et al. apontaram células dendríticas maduras (CD80+ e CD86+) em contato com linfócitos T, realizando a apresentação dos antígenos.

Aroonrerk et al., (2003), a fim de detectar o tipo de resposta T<sub>H</sub> induzida por DCs tratadas com extrato de *P. gingivalis*, co-cultivaram MDDCs com linfócitos T autólogos isolados do tecido gengival de três pacientes com periodontite crônica. Após seis dias de cultura dos monócitos em meio contendo IL-4 e GM-CSF, as células dendríticas imaturas foram identificadas através de imunofenotipagem. As MDDCs apresentavam CD40, CD80, CD86 e HLA-DR em grandes quantidades, baixa expressão de CD14 e mais de 90% das células expressavam CD1a. Essas células foram tratadas com lisado de *P. gingivalis* por 24 horas o que induziu a maturação das MDDCs, indicada pelo aumento de expressão das moléculas CD40, CD80, CD86 e HLA-DR e pela expressão do marcador de maturação CD83. Os linfócitos T autólogos foram co-cultivados com as MDDCs tratadas com *P. gingivalis* e a resposta proliferativa aumentou conforme o maior número de MDDCs. O sobrenadante dessa co-cultura foi analisado e altos níveis de IFN $\gamma$  e baixos ou

indetectáveis níveis de IL-5 foram quantificados, sugerindo um direcionamento da resposta para o tipo T<sub>H</sub>1.

Jotwani & Cutler (2003), no intuito de estabelecer as subpopulações de células dendríticas e suas associações com as células T na periodontite crônica, observaram que a lâmina própria da gengiva, além de células de Langerhans, também continha uma população de célula dendrítica dérmica, e a quantidade dessa célula também aumentava na inflamação. Ainda, nos tecidos comprometidos, células de Langerhans, DCs dérmicas e células B contribuíram para o *pool* de DCs maduras CD83+. Significativamente, células dendríticas maduras foram associadas com aglomerados de células T CD4+, sugerindo uma apresentação de antígenos *in situ*.

Em uma revisão da literatura, Cutler & Jotwani (2004) apontaram evidências para o aumento da expressão de CD1a e CD1c na periodontite. Uma delas é a capacidade da *P. gingivalis* em produzir moléculas lipídicas que potencializam a resposta inflamatória.

Considerando, portanto, a importância das células dendríticas na indução da resposta imune contra os periodontopatógenos e do padrão dessa resposta, desenvolveu-se este estudo. Nele se procurou caracterizar o fenótipo e função das DCs estimuladas com diferentes bactérias comumente encontradas nos tecidos periodontais saudáveis ou comprometidos pela periodontite crônica.

### 3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das bactérias *Streptococcus sanguinis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Treponema denticola* na diferenciação, maturação e função das células dendríticas, *in vitro*, de indivíduos periodontalmente saudáveis ou com periodontite crônica.

#### 3.1 Hipóteses

- a) *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. denticola* são capazes de induzir alterações fenotípicas e funcionais nas células dendríticas diferentes daquelas induzidas por *S. sanguinis*;
- b) as alterações fenotípicas e funcionais das células dendríticas são diferentes entre os indivíduos susceptíveis e não-susceptíveis a periodontite crônica.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Casuística

Para a realização do estudo, a casuística foi de cinco indivíduos periodontalmente saudáveis (Grupo 0) e cinco indivíduos com periodontite crônica (Grupo I), tendo preenchido os seguintes critérios:

- a) indivíduos que concordaram previamente com sua inclusão no estudo, assinando termo de consentimento, de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic, Campinas (Anexo A);
- b) grupo 0: indivíduos brasileiros caucasianos com idade entre 48 e 57 anos (1 homem e 4 mulheres), sem perdas dentárias, apresentando periodonto saudável caracterizado pela ausência de perda de inserção clínica periodontal ou recessão gengival, profundidade de sondagem < 3mm e ausência de sangramento à sondagem periodontal;
- c) grupo I: indivíduos brasileiros caucasianos com idade entre 46 e 58 anos (5 homens), sem perdas dentárias, apresentando perda de inserção clínica periodontal  $\geq 4\text{mm}$  em mais de 15% dos dentes, caracterizando, assim, a presença de periodontite crônica (Flemmig, 1999).

O tabagismo foi usado como critério de exclusão, uma vez que é reconhecido como um importante fator de risco para a periodontite (Offenbacher, 1996). Demais fatores de risco ou modificadores da periodontite, como diabetes e uso de drogas antiinflamatórias, antimicrobianas e imunossupressoras durante os seis meses anteriores a doação de sangue foram também considerados como

critérios de exclusão. Indivíduos que não possuíam todos os pré-requisitos para a doação de sangue também foram excluídos.

O exame clínico foi realizado no centro de triagem do Hemocentro da UNICAMP por um examinador treinado com auxílio de uma sonda periodontal milimetrada (PCP-15, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA).

#### **4.2 Coleta de sangue**

Sangue periférico foi obtido dos doadores voluntários no Hemocentro da UNICAMP. Após a coleta, a bolsa de *Buffy-coat* foi transportada em temperatura de 23°C para o Instituto de Ciências Biológicas IV (USP-SP).

#### **4.3 Diferenciação de células dendríticas a partir de monócitos do sangue periférico *in vitro***

Para a purificação de células mononucleares, 50 mL de *Buffy-coat* das bolsas de sangue foram utilizados. Dez mL foram colocados em tubos plásticos cônicos de 50 mL, aos quais foram acrescentados, no fundo do tubo, 12 mL do gradiente de densidade Ficoll-Paque<sup>TM</sup> Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia). O material foi centrifugado a 2470 rpm por 30 minutos a 18°C, a camada de células mononucleares formada foi retirada, colocada em outro tubo juntamente com HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) e centrifugada a 1200 rpm por 10 min. A figura 1 mostra a pipetagem da camada de mononucleares. As células foram lavadas por mais 2 vezes a 1000 e 900 rpm, respectivamente, para eliminação das plaquetas. O *pellet* foi coletado, as células quantificadas, ressuspendidas em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino

(SBF) [R-10] e colocadas em cultura, na concentração de  $1 \times 10^7$ /mL utilizando-se placas de cultura de 12 poços. As células foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> por 2h a 37°C, para aderência.



Figura 1 - Pipetagem da camada de mononucleares concentrados na fase branca.

Após esse período, as células não-aderentes foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido na concentração de  $5 \times 10^5$ /mL e as aderentes cultivadas por 7 dias em meio R-10 acrescido de 50ng/mL de IL-4 e 50ng/mL de GM-CSF para a geração de células dendríticas. No quarto dia, as bactérias *S. sanguinis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. denticola* foram adicionadas às células (figura 2) e 50ng/mL de IL-4 e 50ng/mL de GM-CSF foram repostas. No quinto dia da cultura, adicionou-se ainda 50ng/mL de TNF- $\alpha$  (figura 3) para a ativação das células dendríticas. Células não-estimuladas pelas bactérias foram usadas como controle. Após sete dias de cultura, as placas foram submetidas a um banho de gelo por 10 minutos, para facilitar a retirada e coleta das células aderentes. As células foram

centrifugadas a 1200 rpm, por 10 minutos, ressuspensas em meio R-10 e a viabilidade celular foi testada com Azul de Trypan 0,4 %.

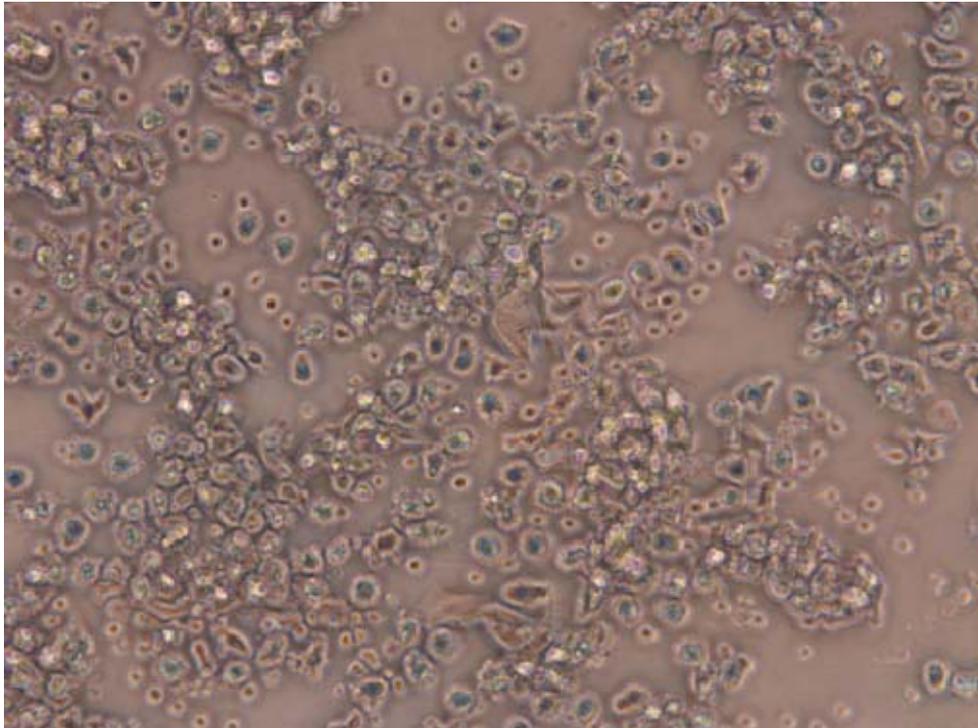


Figura 2 - Células dendríticas imaturas estimuladas com fragmentos de *Porphyromonas gingivalis* (Microscopia de contraste de fase, 400x).



Figura 3 - Células dendríticas maduras após o estímulo com fragmentos de *Porphyromonas gingivalis* e TNF- $\alpha$  (Microscopia de contraste de fase, 400x).

#### 4.4 Preparo das bactérias

*Prevotella intermedia* (ATCC 49046), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Treponema denticola* (ATCC 35405), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 49296) foram compradas (<http://www.atcc.com>) e ativadas de acordo com o protocolo recomendado pela ATCC.

Para reativação da bactéria *Streptococcus sanguinis*, foi adicionado 0,5 mL de meio de cultivo BHI em caldo (Biolife, Milano, Italy) à bactéria liofilizada e homogeneizado. A bactéria reidratada foi transferida para um tubo de ensaio contendo 4,5 mL do meio de cultivo, inoculada em placas de cultivo e *slants* contendo agar BHI (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) e incubada a 37°C por 48 horas.

Para reativação das bactérias *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis*, foi adicionado 0,5 mL de meio de cultivo BHI em caldo (Biolife, Milano, Italy) à cada bactéria liofilizada e homogeneizado. A bactéria reidratada foi transferida para um tubo de ensaio contendo 4,5 mL do meio de cultivo, inoculada em placas de cultivo e *slants* contendo agar sangue Triptose (Vetec, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) suplementado com hemina bovina (5µg/mL) (Cristal Purex, Inlab, São Paulo, São Paulo, Brasil), menadione (0,5µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 5% de sangue de carneiro desfibrinado (Microlab, Campinas, São Paulo, Brasil) e incubada em jarra de anaerobiose (Permutation, Curitiba, Paraná, Brasil) com gerador de anaerobiose (Anaerogen, Oxoid Ltd, Wade Road, Basingstoke, Hants, UK) a 37°C por 14 dias.

Para reativação da bactéria *Treponema denticola*, foi adicionado 0,5 mL de meio de cultivo BHI em caldo (Biolife, Milano, Italy) à bactéria liofilizada e homogeneizado. A bactéria reidratada foi transferida para um tubo de ensaio contendo 4,5 mL do meio de cultivo, inoculada em placas de cultivo e *slants* contendo Tryptic soy agar (Biolife, Milano, Italy) suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado (Microlab, Campinas, São Paulo, Brasil) e incubada em jarra de anaerobiose (Permutation, Curitiba, Paraná, Brasil) com gerador de anaerobiose (Anaerogen, Oxoid Ltd, Wade Road, Basingstoke, Hants, UK) a 37°C por 6 dias.

As bactérias foram mortas por calor, através de fervura conforme o seguinte protocolo. As colônias bacterianas foram coletadas da placa de cultivo e colocadas em um tubo Eppendorf contendo 1 mL de BHI em caldo, foi feita uma centrifugação por 2 minutos na velocidade de 2000 rpm e o BHI em caldo foi retirado e descartado. Em seguida, foram acrescentados 500µL de água MiliQ (Direct-Q,

Millipore) no tubo com o *pellet*, homogeneizado e fervido por 10 minutos em banho-maria; o extrato bacteriano foi filtrado e armazenado no freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

O extrato bacteriano foi avaliado quanto à concentração protéica empregando-se o kit de quantificação de proteína BCA *Protein Assay Kit* (Sigma-Aldrich Biotechnology, St. Louis, MO) e as leituras foram feitas em leitora de ELISA.

#### **4.5 Análise de marcadores de maturação por Citometria de Fluxo**

Para determinação do fenótipo de membrana, células obtidas das culturas foram marcadas com anticorpos monoclonais comerciais (Caltag Lab) contra os seguintes marcadores: CD11c (marcador de DCs mielóides), CD123 (marcador de DCs plasmocitóides), CD80 (B7-1, molécula co-estimuladora), CD83 (marcador de DCs ativadas/maduras), CD86 (B7-2, molécula co-estimuladora), CD1a (marcador de DCs derivadas de monócitos *in vitro*), CD14 (marcador de monócitos, ausente em DCs), HLA-DR (MHC II) e CCR7 (receptor para quimiocinas, expresso por DCs ativadas/maduras - R&D Systems).

##### **4.5.1 Análise das moléculas de superfície**

Após contagem, alíquotas de  $5 \times 10^5$  células obtidas das culturas foram colocadas em tubos plásticos (Eppendorf) de 1,5 mL e centrifugadas por 5 min, a 1200 rpm e  $4^{\circ}\text{C}$  para obtenção de um *pellet*, ao qual foram adicionados anticorpos específicos para os marcadores de interesse. As células foram incubadas por 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após este período, o material foi lavado por 2 vezes (5 min, 1200 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ) com  $500\mu\text{L}$  de tampão para citometria (PBS suplementado com 0,5% de

soroalbumina bovina e 0,02% de azida sódica). Após as lavagens, as células, já marcadas, foram ressuspensas em 500 $\mu$ L de tampão para citometria e analisadas no citômetro de fluxo (FACSCalibur) utilizando-se o *software* Cell Quest para a aquisição das amostras. Os dados obtidos foram analisados usando-se o *software* WinMDI 2.8.

As MDDCs maduras provenientes de indivíduos periodontalmente saudáveis ou com periodontite, tratadas com os lisados bacterianos de *S. sanguinis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. denticola* foram analisadas por citometria de fluxo quanto ao tamanho e granulosidade celular, intensidade de fluorescência e porcentagem de células expressando as moléculas de superfície HLA-DR, CD11c, CD14, CD80, CD86, CD83, CD1a, CCR7 e CD123.

Para exclusão das células mortas e *debris*, todas as amostras submetidas à citometria de fluxo foram analisadas dentro do *gate* R1, conforme ilustrado na figura 4 abaixo.

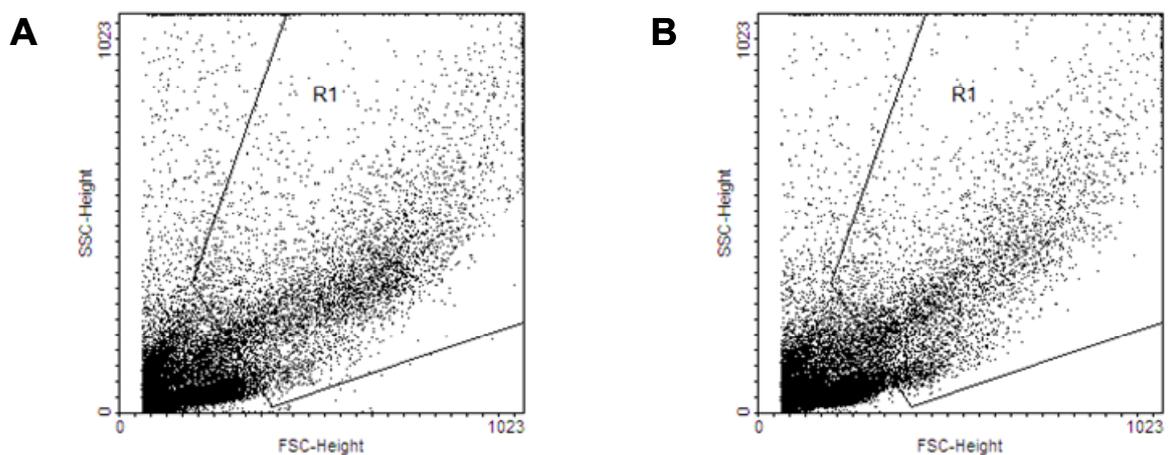


Figura 4 - *Dot Plot* das MDDCs controle. A. Grupo saudável; B. Grupo periodontite. O *gate* R1 foi desenhado para selecionar as células de maior tamanho (FSC) e granulosidade (SSC).

A partir do *gate* R1 foi feito um *Density Plot*, cruzando-se os marcadores HLA-DR e CD11c, e um *gate* R2 foi desenhado para que somente as células HLA-DR+ CD11c+ fossem incluídas na análise (figura 5). Dessa maneira, nosso objetivo foi assegurar que a população analisada tivesse em sua membrana moléculas de superfície representativas de células dendríticas, uma vez que HLA-DR e CD11c são marcadores que indicam que as células geradas têm características fenotípicas de células dendríticas.

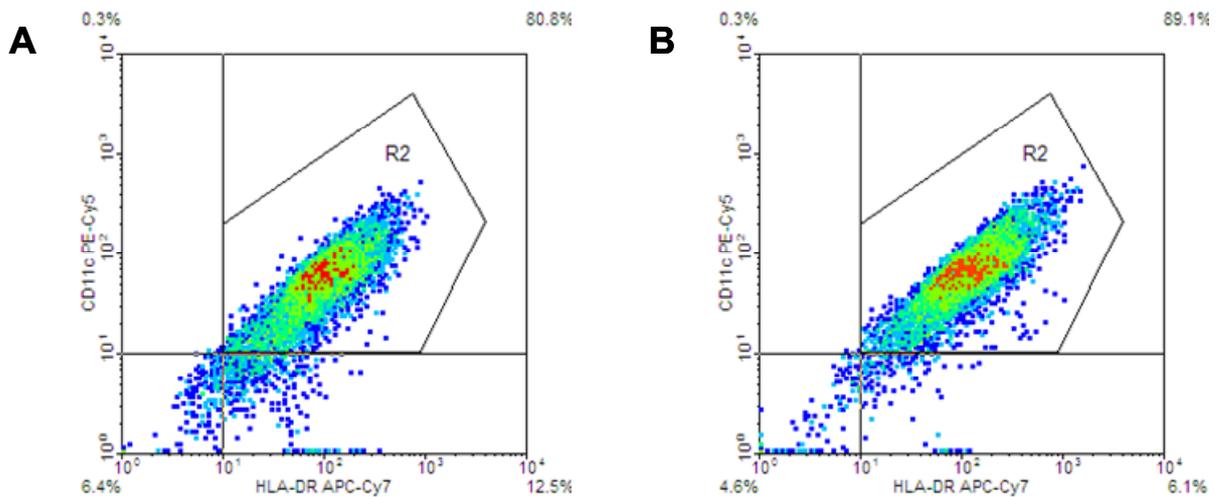


Figura 5 - *Density Plot* representativo da expressão de HLA-DR e CD11c nas MDDCs controle. A. Grupo saudável; B. Grupo periodontite. O *gate* R2 foi desenhado para selecionar as células HLA-DR+ CD11c+ caracterizando assim as DCs mielóides.

## 4.6 Separação de linfócitos T para ensaio proliferativo

### 4.6.1 Preparação das hemácias de carneiro

As hemácias de carneiro para formação de rosetas com linfócitos T (Saxon et al., 1976) foram preparadas para separação destas células das amostras de sangue periférico de doadores saudáveis. As hemácias foram colocadas em um tubo plástico estéril de 50 mL e centrifugadas a 2100 rpm durante 10 minutos a 20°C, e a

seguir lavadas 2 vezes, com mesma centrifugação, em meio RPMI-1640 e mais duas vezes em tampão PBS. Estas hemácias foram tratadas com AET (2-aminoethylisothiuronium bromide hydrobromide; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para mudar a carga elétrica da superfície das hemácias, possibilitando uma maior interação eletrostática com linfócitos T e a formação de rosetas estáveis. Para tanto, foram diluídos 0,5 g de AET em 12,5 mL de água bidestilada e deionizada, com ajuste final do pH para 9,0 utilizando-se NaOH 1,0 N (Reagen, RJ). Após passagem em filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore), 8 mL de solução de AET foram acrescentados a cada 2 mL de papa de hemácias de carneiro e mantidos durante 20 a 40 minutos a 37°C.

A seguir, as hemácias foram lavadas com tampão PBS, pH 7,2 (centrifugação a 1800 rpm por 10 minutos), até obtenção de sobrenadante claro e ressuspensas até se obter uma suspensão a 4% em R-10.

#### **4.6.2 Recuperação de linfócitos T**

Uma suspensão de linfócitos em concentração máxima de  $1 \times 10^7$  células/mL foi preparada, misturada com soro fetal bovino e hemácias de carneiro pré-tratadas com AET (preparação AET-SRBC) como descrito anteriormente, numa proporção de 2:1:2, centrifugada a 800 rpm, por 5 minutos a 4°C e incubada em gelo por 1 hora. Após a incubação, as células foram novamente ressuspensas e o número de rosetas contado. A suspensão foi submetida à centrifugação sobre Ficoll-Paque (2100 rpm, 4°C, 35 minutos).

Após a centrifugação, os linfócitos T estavam no *pellet*, no fundo do tubo, formando rosetas com as hemácias de carneiro modificadas. Os linfócitos T foram

recuperados com tampão de lise de hemácias e as células lavadas em meio de cultura (R-10), com centrifugação a 1200 rpm, durante 10 minutos a 18°C. Os linfócitos T foram ressuspensos em meio R-10, quantificados em câmara de Neubauer, e sua concentração ajustada para  $1 \times 10^5$  células/mL.

#### **4.7 Avaliação da atividade aloestimuladora das DCs**

Para avaliação da proliferação celular, os linfócitos T foram incubados em tampão PBS-BSA 0,1%, contendo 5 $\mu$ M de CFSE (Lyons, 2000). A incubação foi feita a 37°C, no escuro, por 10 min. Após este período, as células foram lavadas 2 vezes em meio R-10, 1200 rpm a 18°C por 5 minutos. MDDCs controle ou estimuladas pelas bactérias por 48 horas, na concentração de  $10^4$ , foram irradiadas (1250 rads, 15 minutos), para evitar sua multiplicação eventual, e co-cultivadas com  $3 \times 10^5$  células/mL linfócitos T alogênêicos em um volume final de 200  $\mu$ L/poço. As células foram mantidas por 7 dias em estufa com atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e saturada de água (estufa de CO<sub>2</sub>), a 37°C. A proliferação dos linfócitos foi avaliada por citometria de fluxo.

#### **4.8 Detecção da produção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)**

Para detecção de citocinas nos sobrenadantes das culturas utilizamos os kits DuoSets para citocinas (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Neste método, placas de 96 poços Maxisorp (Nunc) foram sensibilizadas com 50 $\mu$ L por poço de anticorpo de captura (4 $\mu$ g/mL) para cada citocina (IL-10, IL-12 e IFN $\gamma$ ), diluído em tampão carbonato (pH 9,5) e mantidas a 4°C *overnight*. Após 3 lavagens com 200 $\mu$ L/poço de tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween 20, pH 7,0), as

placas foram bloqueadas com 200 $\mu$ L/poço de tampão de bloqueio (PBS contendo 10% de soro fetal bovino) por 1h a temperatura ambiente. Em seguida, após 3 lavagens, as amostras e a curva-padrão foram incubadas por um período de 2h em temperatura ambiente. As amostras para dosagem foram diluídas 1:2 em tampão de diluição (PBS contendo 10% de soro fetal bovino). Para a curva-padrão, as citocinas recombinantes foram incubadas em duplicatas de 45 $\mu$ L por poço das diluições seriadas (fator 2 de diluição), conforme recomendações do fabricante. Após cinco lavagens, foram adicionados 50 $\mu$ L/poço de anticorpo de detecção e estreptoavidina diluídos em tampão de diluição e seguiu-se nova incubação, no escuro, por 1h a temperatura ambiente. Após esse período e outra lavagem (3 vezes), 50 $\mu$ L/poço de substrato ( $H_2O_2$  e tetrametilbenzidina, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) foram adicionados, com incubação de 30 min, no escuro, em temperatura ambiente. Por fim, 50 $\mu$ L/poço de  $H_2SO_4$  (2N) foram adicionados para interromper a reação e a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro com filtro de 450nm. O cálculo das concentrações foi feito com auxílio do *software* Softmax Pro, através da equação de regressão linear com base na curva padrão.

Os limites de detecção nos ensaios realizados foram de 7.8 pg/mL para as dosagens de IL-10 e IL-12 e 4.7 pg/mL para as dosagens de IFN $\gamma$ .

#### **4.9 Análise estatística**

A análise estatística teve início com a determinação do padrão de distribuição dos dados nas amostras, pelo método de Levene. Quando a distribuição era normal foi utilizado um teste paramétrico, sendo o teste t não-pareado o escolhido para comparação entre os grupos. Quando os dados não seguiam a

distribuição normal, foi utilizado um teste não-paramétrico, sendo o teste de Mann-Whitney o escolhido para verificar se havia diferenças entre os grupos. Em todas as análises, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p \leq 0.05$ . As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software Statistica* versão 6.0 (StatSoft Inc., 2003).

## 5 RESULTADOS

As células dendríticas constituem uma população altamente heterogênea que pode ser dividida em diferentes subpopulações. Todas as subpopulações de DCs mielóides expressam as moléculas HLA-DR e CD11c e podem ser caracterizadas pela expressão diferencial das moléculas CD80 e CD86 (DCs com capacidade de co-estimulação) e CD83 (DC ativada/madura).

A figura 4 do item Material e Métodos mostra o perfil das células obtidas quanto ao tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Observa-se que boa parte das células é grande e granulosa. Essa população foi determinada como população de estudo para verificação dos marcadores de subpopulação.

A análise inicial das subpopulações foi realizada utilizando-se os anticorpos anti-HLA-DR e anti-CD11c. Os gráficos da figura 5 do item Material e Métodos mostram que pelo menos 80% das células da população de estudo co-expressam as moléculas HLA-DR e CD11c.

Em conjunto, esses resultados mostram que o protocolo utilizado permite a obtenção de células dendríticas imaturas que podem ser maturadas pelo estímulo com TNF- $\alpha$ .

As tabelas com os valores absolutos dos resultados da citometria de fluxo estão localizadas no Anexo C.

## 5.1 Rendimento e morfologia das MDDCs

No grupo saudável, o rendimento da população de MDDCs apresentou um aumento após o tratamento com os diferentes lisados bacterianos (tabela 1). A porcentagem das MDDCs apresentando maior tamanho e granulosidade aumentou quando as células foram estimuladas com os lisados de *S. sanguinis*, *P. gingivalis* e *T. denticola* (tabela 2 e figura 6).

No grupo periodontite, o efeito dos diferentes lisados bacterianos sobre o rendimento da população de MDDCs foi oposto ao observado no grupo saudável (tabela 1). Quanto à morfologia, os diferentes lisados diminuíram o tamanho e granulosidade das células (tabela 2 e figura 6).

Tabela 1 - Rendimento das MDDCs. O tratamento com os diferentes lisados bacterianos aumentou o rendimento (R) das MDDCs no grupo saudável e diminuiu no grupo periodontite. E = erro padrão da média. p obtido no teste t não-pareado.

	Controle		<i>S. sanguinis</i>		<i>P. gingivalis</i>		<i>P. intermedia</i>		<i>T. denticola</i>	
	R	E	R	E	R	E	R	E	R	E
Saudável	467000	129341	586000	341374	598000	304818	866000	484310	524000	281719
Periodontite	684000	193122	588000	150479	438000	132000	348000	45100	402000	116034
p	0.38		0.44		0.15		0.12		0.16	

Tabela 2 - Morfologia das MDDCs. No grupo saudável, *S. sanguinis*, *P. gingivalis* e *T. denticola* aumentaram a porcentagem das MDDCs apresentando maior tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), enquanto *P. intermedia* diminuiu. No grupo periodontite, todos os lisados bacterianos diminuíram o tamanho e granulosidade das células. Valores obtidos da diferença entre tratamento e controle. p obtido no teste t não-pareado.

	Saudável %	Periodontite %	p
<i>S. sanguinis</i>	8.9	-2.6	0.04
<i>P. gingivalis</i>	7.2	-0.8	0.04
<i>P. intermedia</i>	-5.4	-3.2	0.32
<i>T. denticola</i>	7	-1.6	0.05

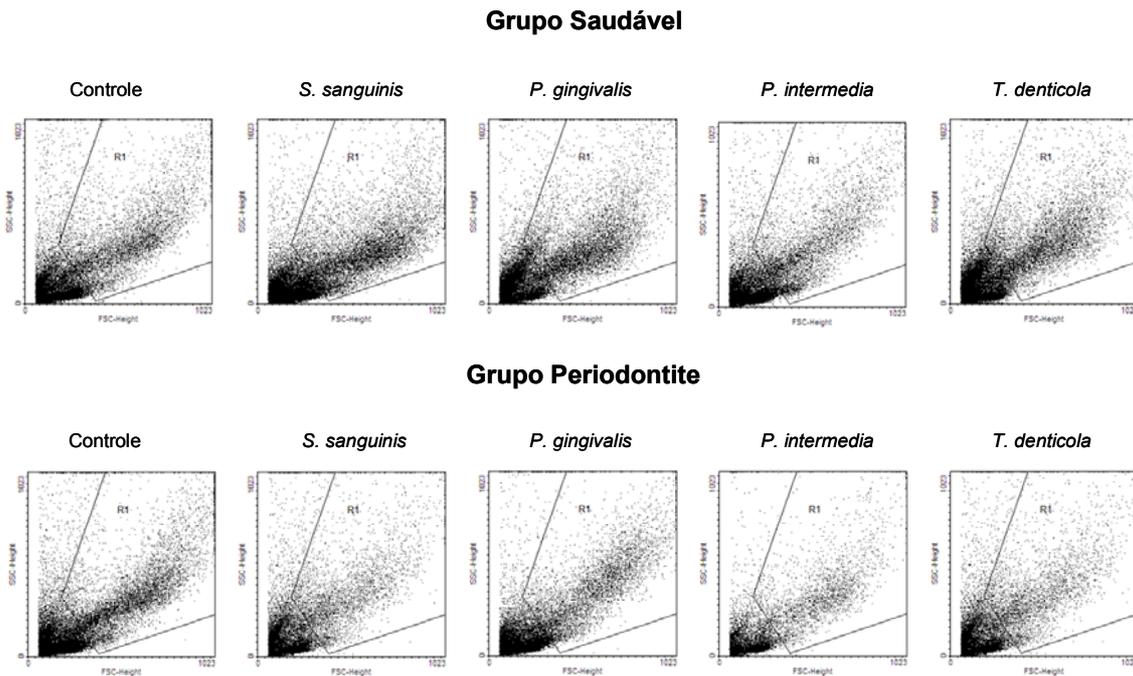


Figura 6 - Apresentação de um caso representativo da morfologia das MDDCs. MDDCs tratadas com TNF- $\alpha$  foram usadas como controle. As diferenças observadas entre os grupos, com exceção da *P. intermedia*, foram estatisticamente significantes ( $p \leq 0.05$ ).

## 5.2 Diferenciação e maturação das MDDCs

### 5.2.1 *Streptococcus sanguinis*

No grupo saudável, *S. sanguinis* aumentou o número de eventos e a porcentagem de células positivas das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, mas diminuiu CCR7. Contrariamente, no grupo periodontite, o número e a porcentagem de células CD80+, CD86+ e CD83+ foram diminuídas, mas a porcentagem de células CCR7+ foi aumentada (tabela 3).

Tabela 3 - Número de células positivas (Eventos), porcentagem de células positivas e intensidade de fluorescência (MIF) para as moléculas de membrana HLA-DR, CD11c, CD14, CD80, CD86, CD83, CD1a, CCR7 e CD123 das MDDCs tratadas com *S. sanguinis*. p obtido no teste t não-pareado.

<i>Streptococcus sanguinis</i>									
	Eventos			Porcentagem			MIF		
	Saudável	Periodontite	p	Saudável	Periodontite	p	Saudável	Periodontite	p
HLA-DR	1329	-872	0.08	-1	-16	0.32	-16	46	0.28
CD11c	773	-516	0.10	2	-8	0.34	-23	-45	0.19
CD14	-310	-811	0.61	-15	4	0.43	4	3	0.89
CD80	1473	-312	0.16	11	-10	0.22	-4	0	0.19
CD86	376	-506	0.28	19	-53	0.11	57	-35	0.36
CD83	130	-286	0.18	0	-6	0.48	-2	4	0.04
CD1a	664	231	0.80	1	-6	0.81	19	4	0.60
CCR7	-803	-139	0.52	-10	4	0.27	-3	5	0.10
CD123	115	-625	0.24	26	-6	0.14	-9	-23	0.61

### 5.2.2 *Porphyromonas gingivalis*

No grupo saudável, o número e a porcentagem das MDDCs co-expressando as moléculas CD80 e CD86 aumentaram após o tratamento com o lisado da *P. gingivalis*, entretanto a intensidade de fluorescência desses marcadores foi diminuída. A porcentagem de células CCR7+ diminuiu mas a intensidade de fluorescência aumentou. No grupo periodontite, *P. gingivalis* aumentou o número, a porcentagem e a MIF das moléculas CD80 e CD83 (tabela 4).

Tabela 4 - Número de células positivas (Eventos), porcentagem de células positivas e intensidade de fluorescência (MIF) para as moléculas de membrana HLA-DR, CD11c, CD14, CD80, CD86, CD83, CD1a, CCR7 e CD123 das MDDCs tratadas com *P. gingivalis*. p obtido no teste t não-pareado.

<i>Porphyromonas gingivalis</i>									
	Eventos			Porcentagem			MIF		
	Saudável	Periodontite	p	Saudável	Periodontite	p	Saudável	Periodontite	p
HLA-DR	832	5	0.21	-1	-8	0.60	22	50	0.58
CD11c	813	-504	0.01	-5	-9	0.83	-2	37	0.43
CD14	-236	182	0.08	-5	0	0.25	0	4	0.13
CD80	1461	510	0.48	12	2	0.60	-3	2	0.31
CD86	2597	65	0.34	20	-12	0.38	-62	-18	0.47
CD83	173	281	0.54	-1	3	0.29	-3	1	0.27
CD1a	99	-475	0.46	-1	-17	0.53	9	-4	0.35
CCR7	-959	215	0.26	-15	4	0.22	3	-1	0.51
CD123	433	-112	0.21	14	-12	0.18	2	-14	0.28

### 5.2.3 *Prevotella intermedia*

*P. intermedia* aumentou a porcentagem de células positivas e a intensidade de fluorescência das moléculas CD86 e CD83 no grupo saudável, enquanto, no grupo periodontite, diminuiu a porcentagem das células CD86+ e CD83+, mas aumentou a MIF. Ainda no grupo periodontite, a expressão de CCR7 foi aumentada em relação aos três parâmetros (eventos, porcentagem e MIF) (tabela 5).

Tabela 5 - Número de células positivas (Eventos), porcentagem de células positivas e intensidade de fluorescência (MIF) para as moléculas de membrana HLA-DR, CD11c, CD14, CD80, CD86, CD83, CD1a, CCR7 e CD123 das MDDCs tratadas com *P. intermedia*. p obtido no teste t não-pareado.

<i>Prevotella intermedia</i>									
	Eventos			Porcentagem			MIF		
	Saudável	Periodontite	p	Saudável	Periodontite	p	Saudável	Periodontite	p
HLA-DR	-2058	-1287	0.59	-26	-21	0.85	-7	59	0.58
CD11c	-1363	245	0.18	-9	1	0.55	-11	16	0.55
CD14	-469	564	0.22	-16	2	0.16	10	5	0.63
CD80	-293	247	0.42	-7	6	0.10	-3	32	0.07
CD86	-292	-1172	0.19	8	-18	0.08	62	22	0.49
CD83	-81	-348	0.63	1	-9	0.37	9	1	0.53
CD1a	-1373	333	0.29	-9	-32	0.45	22	9	0.75
CCR7	-1416	722	0.20	-25	14	0.06	0	13	0.35
CD123	-279	-1379	0.27	9	-17	0.18	2	-14	0.28

#### 5.2.4 *Treponema denticola*

No grupo saudável, *T. denticola* aumentou o número de eventos e a porcentagem das células co-expressando as moléculas CD80 e CD86, entretanto, diminuiu a intensidade de fluorescência do CD80 e aumentou a do CD86. Similarmente ao efeito do *S. sanguinis*, *T. denticola* diminuiu o CCR7 no grupo saudável. No grupo periodontite, *T. denticola* diminuiu o número de eventos e a MIF das moléculas CD80 e CD86 (tabela 6).

Tabela 6 - Número de células positivas (Eventos), porcentagem de células positivas e intensidade de fluorescência (MIF) para as moléculas de membrana HLA-DR, CD11c, CD14, CD80, CD86, CD83, CD1a, CCR7 e CD123 das MDDCs tratadas com *T. denticola*. p obtido no teste t não-pareado.

	<i>Treponema denticola</i>								
	Eventos			Porcentagem			MIF		
	Saudável	Periodontite	p	Saudável	Periodontite	p	Saudável	Periodontite	p
HLA-DR	730	-190	0.33	-7	7	0.51	-15	1	0.45
CD11c	1100	654	0.52	3	18	0.30	26	-23	0.31
CD14	-726	-1150	0.67	-26	-19	0.81	0	10	0.36
CD80	912	-352	0.04	16	-4	0.21	-11	-1	0.26
CD86	3685	-51	0.12	61	20	0.36	48	-20	0.13
CD83	54	1739	0.03	-6	23	0.20	1	-12	0.13
CD1a	78	3010	0.01	13	19	0.20	-42	79	0.26
CCR7	-653	1604	0.13	-24	59	0.05	-2	3	0.61
CD123	-302	1380	0.11	-4	17	0.48	-6	-25	0.17

### 5.3 Proliferação das células T alogênicas

No grupo saudável, MDDCs tratadas com *S. sanguinis* induziram o aumento da proliferação das células T alogênicas. Por outro lado, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. denticola* diminuíram a proliferação (tabela 7, figura 7).

No grupo periodontite, o aumento da proliferação das células T foi induzido apenas pelas MDDCs tratadas com *S. sanguinis* e *T. denticola*. Os outros tratamentos não afetaram a proliferação das células T (tabela 7, figura 7).

Tabela 7 - Proliferação das células T alogênicas. No grupo saudável, apenas o *S. sanguinis* aumentou a proliferação das células T, enquanto, no grupo periodontite, *S. sanguinis* e *T. denticola* aumentaram a proliferação. Valores obtidos da divisão do controle pelo tratamento. p obtido no teste t não-pareado.

	Saudável	Periodontite	p
<i>S. sanguinis</i>	2	2	0.09
<i>P. gingivalis</i>	1	1	0.42
<i>P. intermedia</i>	1	1	0.15
<i>T. denticola</i>	1	2	0.1

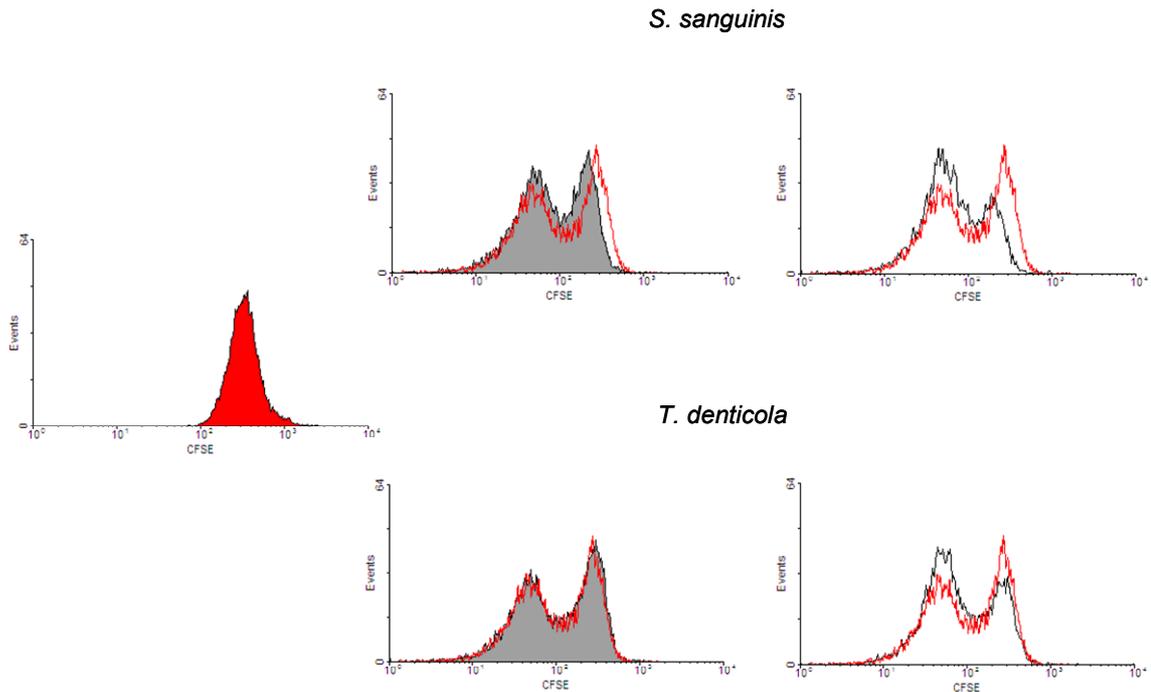


Figura 7 - Os linfócitos T alogênicos foram tratados com CFSE e a proliferação avaliada pela diluição do marcador entre as células-filhas. O histograma com preenchimento em vermelho representa o controle de linfócitos (sem o estímulo das MDDCs). O histograma vermelho representa o controle de linfócitos + MDDCs sem tratamento bacteriano. O histograma com preenchimento em cinza representa as células dos indivíduos saudáveis e o histograma preto, as células dos indivíduos com periodontite. No grupo saudável, *S. sanguinis* aumentou a proliferação, enquanto não houve modulação pelo *T. denticola*. No grupo periodontite, *S. sanguinis* e *T. denticola* aumentaram a proliferação. As diferenças observadas entre os grupos tenderam a resultados estatisticamente significativos ( $p \leq 0.1$ ).

#### 5.4 Produção de IFN $\gamma$ , IL-10 e IL-12 pelas MDDCs

Os resultados da produção de IL-10 e IFN $\gamma$  pelas MDDCs estão apresentados nas figuras 8 e 9 abaixo. IL-12 não foi detectada em ambos os grupos. No grupo saudável, a secreção de IL-10 foi super-regulada pelos tratamentos, enquanto a produção de IFN $\gamma$  foi diminuída por *S. sanguinis* e *P. intermedia* e não detectada após os tratamentos com *P. gingivalis* e *T. denticola*.

No grupo periodontite, apenas *P. intermedia* aumentou a produção de IL-10, enquanto todos os lisados bacterianos diminuíram a produção de IFN $\gamma$ .

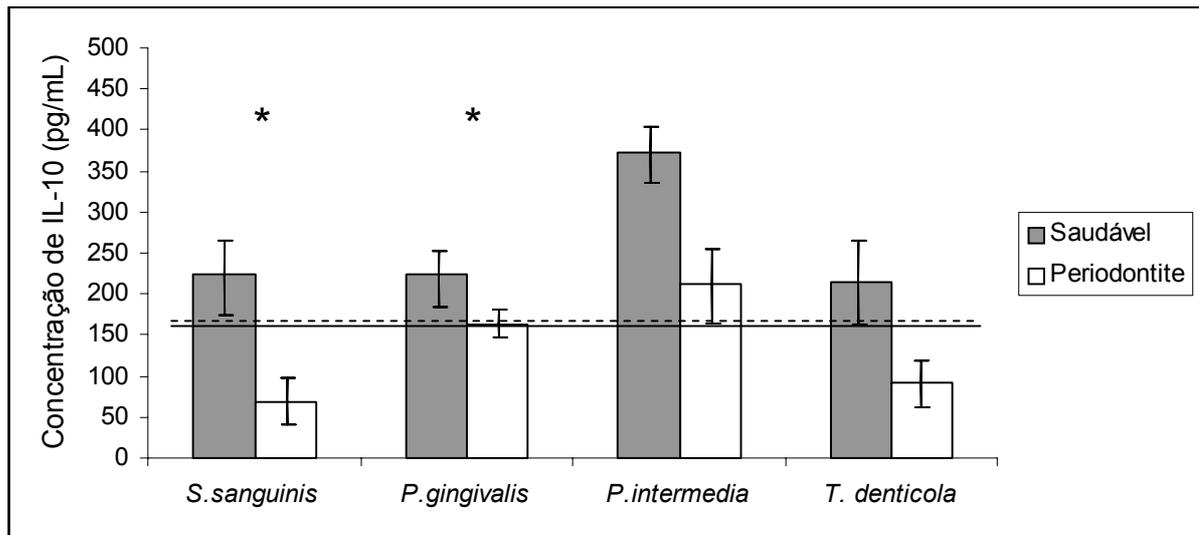


Figura 8 - Concentração de IL-10 no sobrenadante das MDDCs. No grupo saudável, os lisados bacterianos aumentaram a produção de IL-10, enquanto no grupo periodontite apenas a *P. intermedia* aumentou a produção dessa citocina. As barras indicam o erro padrão. O traço corresponde ao controle do grupo saudável e a linha tracejada corresponde ao controle do grupo periodontite. \*  $p \leq 0.1$  obtido no teste t não-pareado.

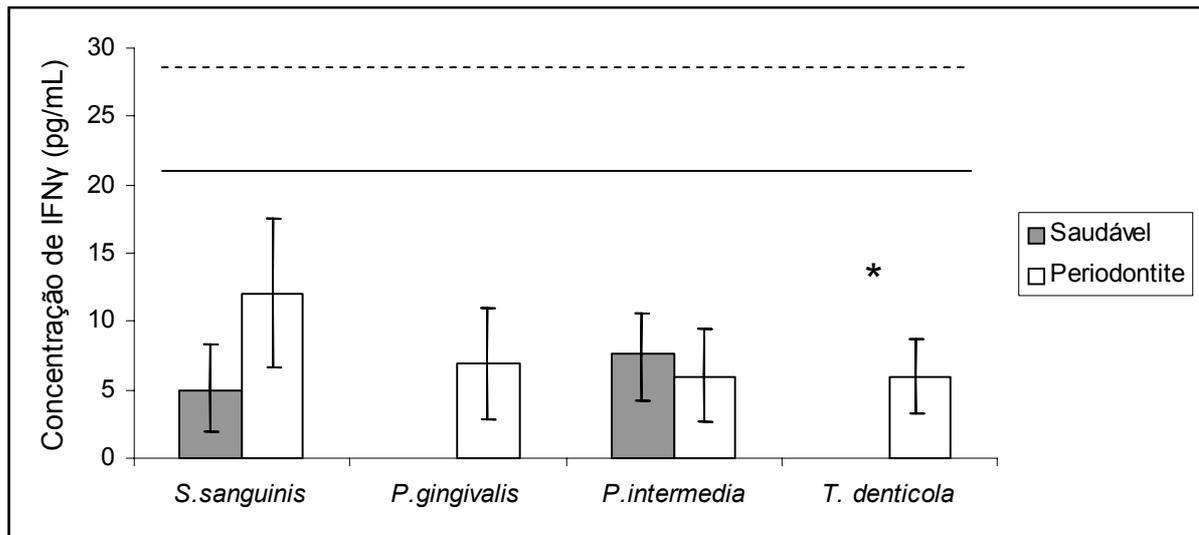


Figura 9 - Concentração de IFN $\gamma$  no sobrenadante das MDDCs. Em ambos os grupos, os lisados bacterianos diminuíram a produção de IFN $\gamma$ , sendo que, no grupo saudável, a citocina não foi detectada no sobrenadante das MDDCs tratadas com *P. gingivalis* e *T. denticola*. As barras indicam o erro padrão. O traço corresponde ao controle do grupo saudável e a linha tracejada corresponde ao controle do grupo periodontite. \*  $p \leq 0.1$  obtido no teste t não-pareado.

### 5.5 Produção de IFN $\gamma$ , IL-10 e IL-12 pelos linfócitos T alogênicos

Os resultados da produção de IL-10 e IFN $\gamma$  pelos linfócitos T alogênicos estão apresentados nas figuras 10 e 11 abaixo. IL-12 não foi detectada em ambos os grupos. A secreção de IL-10 foi diminuída em ambos os grupos, independente da espécie bacteriana, enquanto que a produção de IFN $\gamma$  no grupo periodontite foi aumentada quando as MDDCs foram pulsadas com *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. denticola*. No grupo saudável, apenas *P. gingivalis* e *T. denticola* aumentaram a produção de IFN $\gamma$ .

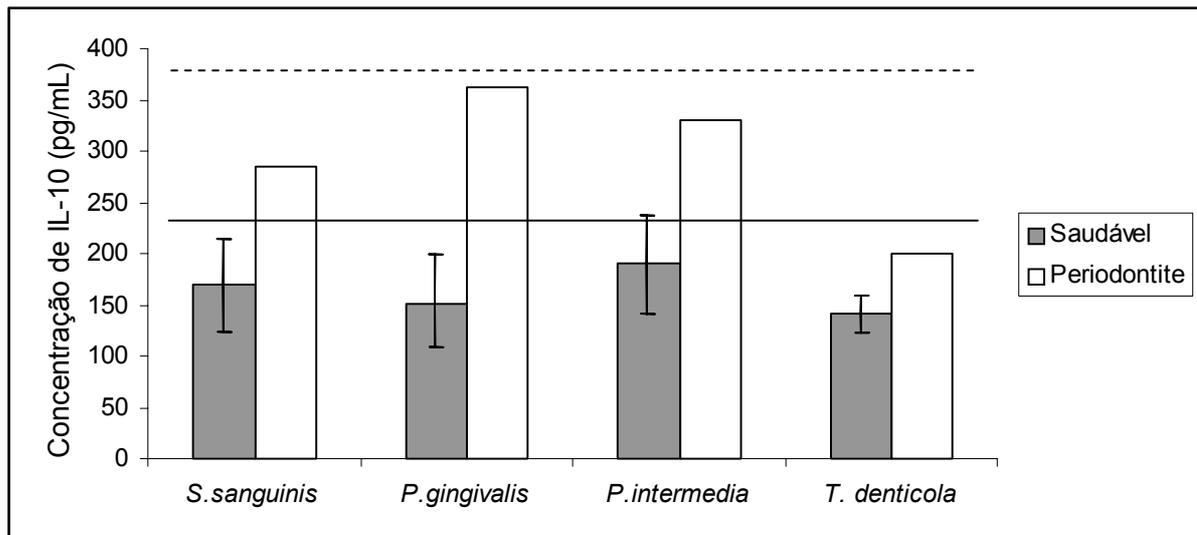


Figura 10 - Concentração de IL-10 no sobrenadante da co-cultura dos linfócitos alogênêicos com as MDDCs tratadas com os lisados bacterianos. A produção de IL-10 foi diminuída em ambos os grupos. As barras indicam o erro padrão. O traço corresponde ao controle do grupo saudável e a linha tracejada corresponde ao controle do grupo periodontite.

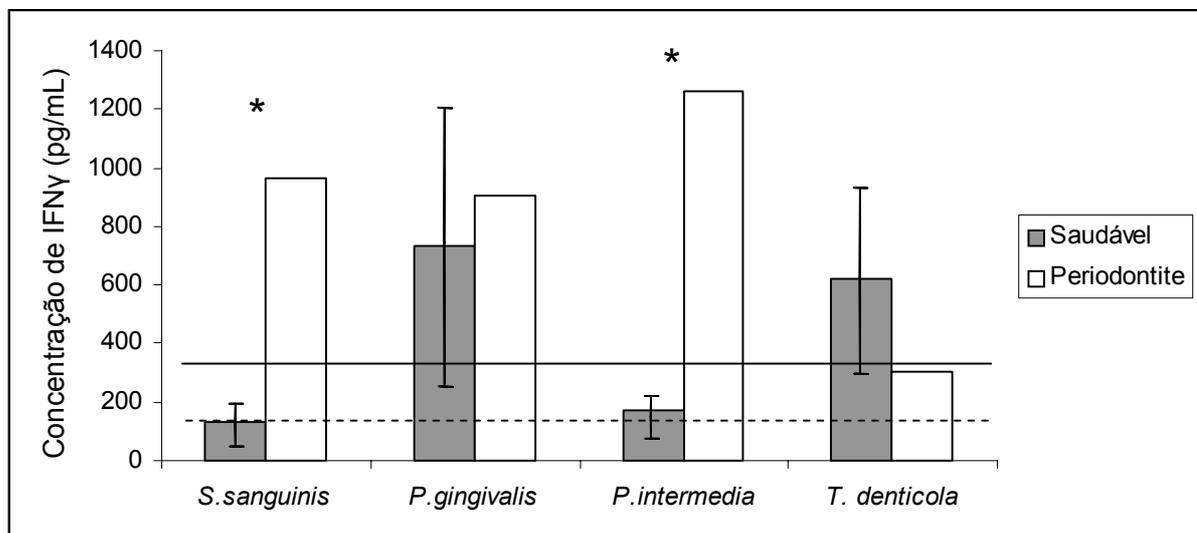


Figura 11 - Concentração de IFN $\gamma$  no sobrenadante da co-cultura dos linfócitos alogênêicos com as MDDCs tratadas com os lisados bacterianos. Todos os lisados aumentaram a produção de IFN $\gamma$  no grupo periodontite. No grupo saudável, apenas *P. gingivalis* e *T. denticola* aumentaram a produção de IFN $\gamma$ . As barras indicam o erro padrão. O traço corresponde ao controle do grupo saudável e a linha tracejada corresponde ao controle do grupo periodontite. \*  $p \leq 0.1$  obtido no teste t não-pareado.

Como pôde ser observado houve diferenças na produção das citocinas entre os grupos estudados, entretanto, nem todas as diferenças foram confirmadas pela análise estatística realizada ( $p > 0.05$ ). Uma possível explicação para que não se atingisse uma diferença estatística significativa é o pequeno número de casos analisados. É interessante relatar também que, para IFN $\gamma$ , houve vários casos de produção de citocina abaixo do limite de detecção para os kit de análise utilizados nesses ensaios.

## 6 DISCUSSÃO

Numerosos fatores regulam a maturação das células dendríticas, incluindo moléculas relacionadas ao patógeno como o LPS, DNA bacteriano e RNA de dupla-fita. Esses fatores influenciam o balanço entre sinais pró e antiinflamatórios no microambiente da infecção, incluindo a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  e prostaglandinas, e os sinais derivados das células T (Banchereau et al., 2000), afetando o curso de muitas doenças, como doença do enxerto versus hospedeiro, dermatite de contato (Enk, 1997), periodontite crônica (Cutler et al., 1998, 1999), psoríase (Homey et al., 2000), hanseníase (Sieling et al., 1999) e vários tumores malignos.

A maturação das células dendríticas derivadas de monócitos (MDDCs) envolve alterações morfológicas e moleculares. Durante a maturação, aumentam o volume citoplasmático e a granulosidade, diminui a atividade fagocitária (Guermonprez et al., 2002), aumentam a expressão de moléculas do MHC II (Zhou, Tedder, 1996; Guermonprez et al., 2002) e de moléculas co-estimuladoras como CD80 e CD86, além da expressão de uma molécula relacionada com a ativação das DCs, a CD83 (Zhou, Tedder, 1996) e da molécula relacionada com a migração das DCs, a CCR7 (receptor de quimiocina) (Dieu et al., 1998), o que permite a apresentação do antígeno à células T naive CD4+ e CD8+, promovendo a resposta imune adaptativa (Porcelli et al., 1999; Banchereau et al., 2000; Guermonprez et al., 2002).

A etiopatogênese da periodontite crônica envolve um estímulo bacteriano por diferentes espécies bacterianas, dentre elas, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Treponema denticola*, à resposta imune do hospedeiro.

Inicialmente, ocorre o estímulo *in situ* das DCs (Cutler et al., 1999), incluindo células de Langerhans e DCs dérmicas (Jotwani, Cutler, 2003), que são distribuídas nos epitélios e tecido conjuntivo periodontal de sítios com diagnóstico de periodontite ou saúde periodontal (Cury et al., 2008a; Cury et al., 2008b). DCs sofrem maturação, sendo identificadas em estado maturo em espécimes de tecido periodontal saudável e na periodontite crônica (Cirrincione et al., 2002; Mahanonda et al., 2002; Aroonrerk et al., 2003).

No presente estudo, MDSCs geradas *in vitro*, similares fenotipicamente e funcionalmente a células dendríticas identificadas na gengiva humana (Jotwani, Cutler, 2003; Aroonrerk et al., 2003; Cohen et al., 2004), foram estimuladas com lisados de diferentes espécies bacterianas periodontais, manipuladas identicamente. Diferentes fenótipos e funções foram induzidos nas MDSCs de indivíduos periodontalmente saudáveis e de indivíduos com periodontite crônica e também houve diferença no efeito das diferentes bactérias. Antes do mais, um ponto que merece ser mencionado foi a grande variação observada entre os indivíduos na expressão dos marcadores e na produção das citocinas, em todas as análises realizadas nesse estudo. Este fenômeno dificultou a análise estatística dos dados e a determinação de padrões distintos para alguns dos parâmetros estudados.

Uma das hipóteses do presente estudo era que a bactéria não-patogênica fosse capaz de induzir alterações fenotípicas e funcionais nas MDSCs diferentes daquelas induzidas pelas bactérias patogênicas. *S. sanguinis* diminuiu a quantidade de células maduras, diminuindo o número de eventos e a porcentagem das células CD80, CD86 e CD83 positivas nos indivíduos com periodontite. Entretanto, induziu, de maneira surpreendente, mesmo na ausência de IL-12, um aumento na proliferação de linfócitos T produtores de IFN $\gamma$ , a mais importante citocina ativadora

da resposta bactericida de macrófagos. Uma possível explicação para tal observação seria o fato de que o *S. sanguinis* é um comensal da microbiota periodontal, e a interação desses microrganismos com as células epiteliais induz um estado de inflamação fisiológica, que ajuda a conter os comensais na superfície mucosa, mantendo uma co-existência harmoniosa entre microrganismo e hospedeiro (Kinane et al., 2007). Entretanto, uma invasão acidental da mucosa (conseqüência de um trauma, por exemplo) induz uma intensa resposta imune a fim de eliminá-lo. Assim, nós sugerimos que o lisado dessa bactéria também é capaz de estimular as MDDCs a produzirem uma forte resposta imune *in vitro*. De certa forma confirmando nossa observação, Kopitar et al. (2006) relataram que MDDCs incubadas com um outro comensal oral, o *Bacteroides fragilis*, direcionam a diferenciação de linfócitos T naive em linfócitos T<sub>H</sub>1. Certamente, é necessário investigar a expressão de outras citocinas padrão T<sub>H</sub>2, como IL-4 e IL-6, nas MDDCs tratadas com *S. sanguinis*.

Intrigantemente, o comportamento funcional das MDDCs pulsadas com *P. intermedia*, em relação às citocinas secretadas pelos linfócitos, em ambos os grupos, foi equivalente ao promovido pela bactéria não-patogênica. Ora, se o tratamento das MDDCs com diferentes espécies bacterianas, patogênica ou não, apesar de induzir diferentes fenótipos, não promove distintas funções das MDDCs, o que estaria regulando a produção de citocinas que ativam os linfócitos a desenvolver uma resposta semelhante? É importante lembrar que diferentes estados de ativação acarretam mudanças funcionais nas células dendríticas. O microambiente em que se dá a apresentação de antígeno é um fator importante, capaz de determinar como a resposta imune irá se desenvolver. Sendo assim, nossos resultados a respeito das citocinas produzidas pelas MDDCs e, portanto, presentes no microambiente durante

a co-cultura entre MDDCs e células T, nos trazem informações importantes que serão discutidas a seguir.

A produção de IFN $\gamma$  pelas MDDCs tratadas com qualquer um dos lisados bacterianos foi diminuída em ambos os grupos. Esse achado está em concordância com a literatura, que relata a detecção de baixos níveis de IFN $\gamma$  em pacientes com periodontite crônica (Jotwani et al., 2001). Uma possível explicação para tal, poderia ser atribuída aos altos níveis da citocina antiinflamatória IL-10 (Wang et al., 1999).

Em nossos experimentos, demonstramos que diferentes bactérias são capazes de estimular as MDDCs a induzirem diferentes respostas de células T que ativam a produção de diferentes citocinas. Entretanto, considerável heterogeneidade no perfil de citocinas pode ser observada nos diferentes clones de células T, sugerindo que os fenótipos globais T<sub>H1</sub> e T<sub>H2</sub> podem apenas representar dois extremos de todos os fenótipos possíveis (Kelso, 1995). O tipo de citocina produzida precocemente em uma resposta imune parece ser a chave que determina qual resposta imune T<sub>H1</sub> ou T<sub>H2</sub> será gerada. Considerando que o perfil de síntese de citocinas das DCs é essencial no estabelecimento das funções efetoras dos linfócitos T (Saint-Vis et al., 1998), a secreção de maiores quantidades de IL-10 pelas MDDCs pode indicar que quando o hospedeiro responde ao estímulo bacteriano com a produção de citocinas inflamatórias (IFN $\gamma$ ), existe uma produção simultânea de citocinas inibitórias (IL-10) para controlar a inflamação. As citocinas podem ativar os linfócitos de forma sinérgica ou antagônica, e o resultado dessa ativação dependerá do balanço entre as ações de várias citocinas (Gemmel et al., 2007). Assim, o balanço entre as produções de IFN $\gamma$  e IL-10 pelas MDDCs pode controlar as funções dos linfócitos T contra as bactérias estudadas *in vitro*.

Contrariando as expectativas iniciais, as MDDCs dos indivíduos saudáveis, pulsadas com o lisado da cepa menos patogênica (*P. intermedia*), apresentaram um fenótipo de células ativadas e com capacidade de co-estimulação (CD83+ CD86+), entretanto, não foram capazes de modular a proliferação dos linfócitos T. Uma possível explicação seria o fato de que uma grande quantidade de IL-10 fora detectada no sobrenadante das MDDCs pulsadas com *P. intermedia*, e essa IL-10 poderia estar inibindo a função de apresentação de antígenos das células dendríticas, visto que a IL-10 possui papel imunomodulador e parece suprimir a resposta antígeno-específica das células T (O'Garra, 1998). Adicionalmente, o aumento da expressão de IL-10 pelas MDDCs tratadas neste grupo saudável pode sugerir um padrão de desenvolvimento de tolerância nestes indivíduos. Por outro lado, podemos supor que a produção de IL-10 esteja ligada a um mecanismo de controle da resposta inflamatória, iniciada pela produção de citocinas pró-inflamatórias. Apesar de esta explicação não estar formalmente demonstrada em nosso trabalho, visto que a IL-12 não foi detectada e somente pequenas quantidades de IFN $\gamma$  foram quantificadas no sobrenadante dessas células, há relatos na literatura descrevendo o mesmo fenômeno quanto à produção de IL-10 por MDDCs quando estimuladas por LPS (Jotwani et al., 2001) ou outros agonistas de receptores tipo Toll (Corinti et al., 1999). Além disso, o fato da resposta ser mais regulada em relação a cepa de menor virulência, evidencia a capacidade das DCs em discriminar pequenas alterações nos patógenos e modular a resposta adaptativa adequadamente.

Já no grupo periodontite, as MDDCs pulsadas com *P. intermedia* também secretaram IL-10, entretanto induziram a secreção de altos níveis de IFN $\gamma$  pelos linfócitos T. Um ponto que deve ser mencionado é que, a quantidade e a qualidade

das moléculas co-estimuladoras pode influenciar diretamente o desenvolvimento das células T efectoras (Abbas et al., 1996). Nós observamos que a expressão de CD80 foi aumentada (eventos, porcentagem e MIF) nessas células, o que pode estar associado à produção elevada de citocinas pró-inflamatórias relatada em pacientes com periodontite (Salvi et al., 1998; Takeichi et al., 2000), visto que a expressão de CD80 determina preferencialmente uma resposta T<sub>H</sub>1 (Cutler, Jotwani, 2004).

No grupo periodontite, *S. sanguinis*, *P. gingivalis* e *T. denticola* diminuíram a secreção de IL-10 pelas MDDCs. Foi demonstrado que o LPS da *P. gingivalis* induz menor secreção de IL-10 pelas MDDCs do que o LPS da *E. coli* (Mahanonda et al., 2006). Nesse ponto, poderíamos especular que as bactérias periodontais podem regular a diferenciação, maturação e função das DCs via TLR e que esta ativação é distinta em indivíduos não-susceptíveis a periodontite crônica e em indivíduos com a doença. Os lipopolissacarídeos da *P. gingivalis* e da *E. coli* são reconhecidos pelos TLR2 e TLR4, respectivamente, o que contribui para os diferentes tipos de imunidade adaptativa (por exemplo, o balanço T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2) (Martin et al., 2001). Já foi demonstrado que LPS e lipídio A purificados de *P. gingivalis* são capazes de aumentar a expressão de receptores TLR2 e TLR4 (Hirschfeld et al., 2001; Darveau et al., 2004) e que LPS de *A. actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum* também ligam-se ao TLR4 (Yoshimura et al, 2002; Mochizuki et al, 2004). Através de vias de sinalização intracelulares, os receptores ativam fatores de transcrição que determinam o perfil de citocinas que será produzido (Janeway Junior, Medzhitov, 2002). Dessa forma, a sinalização intracelular via TLR também precisa ser melhor investigada para verificar se o perfil de citocinas induzido por essas bactérias está associado a estes receptores e se a resposta imune gerada será protetora ou patológica ao indivíduo.

Frente a essas observações, confirmamos nossa segunda hipótese, pois pudemos observar as diferentes alterações fenotípicas e funcionais das MDDCs entre os indivíduos susceptíveis e não-susceptíveis à periodontite crônica. Além disso, nossos achados de que as MDDCs dos indivíduos com periodontite crônica pulsadas com os lisados bacterianos apresentaram menor tamanho, são compatíveis com a idéia de que este tamanho diminuído represente uma diminuição da área de superfície destas células, levando então à exposição de uma menor quantidade de moléculas de apresentação de antígenos, bem como de moléculas co-estimuladoras na superfície celular.

Outro fato que chamou muita atenção é que as células dos indivíduos com periodontite, pulsadas com uma das bactérias mais patogênicas, adquirem, *in vitro*, um fenótipo competente em estimular a resposta imune adaptativa. Assim, a expressão de CD83 e a produção da citocina inflamatória IFN $\gamma$  foram maiores em MDDCs pulsadas com *T. denticola* no grupo periodontite. As MDDCs pulsadas com o lisado da espiroqueta também foram capazes de induzir maiores níveis de proliferação de linfócitos T dos indivíduos com a doença. Em conjunto os resultados indicam que as células dendríticas geradas *in vitro* na presença do *T. denticola* adquirem a competência de apresentar antígenos e de estimular a resposta adaptativa induzindo a proliferação de linfócitos T. Entretanto, uma investigação mais a fundo é necessária para se entender como essa bactéria induz, *in vivo*, a resposta imune associada ao desenvolvimento e progressão da doença periodontal.

Em relação ao grupo saudável, uma explicação plausível para justificar a incapacidade funcional das MDDCs pulsadas com *T. denticola* seria o fato de que ocorreu uma sub-regulação da molécula CD1a nesse grupo. A molécula CD1a caracteriza um subtipo de DCs, o das células de Langerhans, inicialmente descritas

como um tipo celular da pele (Sallusto, 2001; Romani et al., 2003). Embora muitos autores descrevam a molécula CD1a como marcador de DCs imaturas (Bell et al., 1999; Iwamoto et al., 2003), outros autores afirmam que o CD1a não está presente em todas as DCs imaturas, mas que é restrito à subpopulação de células de Langerhans (Shortman, Liu, 2002). As moléculas CD1 representam uma classe separada das moléculas tipo MHC e possuem a capacidade de reconhecer e apresentar antígenos lipídicos aos linfócitos T (Porcelli et al., 1999). Assim, no grupo saudável, a diminuição da expressão de CD1a observada nas MDDCs tratadas com *T. denticola* pode indicar que o componente lipídico desse patógeno induz as MDDCs a um estágio de maturação no qual a capacidade de reconhecimento e apresentação de antígenos é reduzida, o que pode representar um mecanismo de modulação da resposta do hospedeiro em indivíduos não-susceptíveis à periodontite.

No presente trabalho, observou-se que as MDDCs do grupo saudável estimuladas pela *P. gingivalis* exibiram um aumento da porcentagem de células com capacidade co-estimuladora, porém com diminuição da intensidade de fluorescência das moléculas co-estimuladoras, e não foram capazes de modular a proliferação dos linfócitos. Estudos prévios relataram que a co-cultura de DCs com lisado de *P. gingivalis*, LPS de *P. gingivalis* e *P. gingivalis* com fímbrias vivas leva à maturação das DCs e proliferação de células T induzida pelas DCs (Aroonrerk et al., 2003, Cohen et al., 2004; Jotwani, Cutler, 2004). A distinta regulação da função das DCs aqui descrita pode estar relacionada às diferenças na purificação das MDDCs e linfócitos, ao estágio de maturação das MDDCs, à forma do antígeno (proteína, peptídeo e extrato total) (Maldonado-Lopez et al., 1999) ou a diferença na susceptibilidade à periodontite dos indivíduos dos diferentes estudos.

Outro ponto que merece ser mencionado é que a expressão do CD86 diminuiu bastante nas MDDCs estimuladas com *P. gingivalis* no grupo periodontite. Sabe-se que a ligação do antígeno ao TCR na ausência do co-estímulo (CD80 e/ou CD86) não apenas causa uma falha na ativação da célula T, como também leva a um estado chamado de anergia, no qual a célula T perde a capacidade de proliferar e produzir citocinas (Powell et al., 1998). Essa condição pode ter um profundo efeito na ativação das células T antígeno-específicas seja por causar anergia e/ou apoptose (Bonasio et al., 2006) ou por atrasar o desenvolvimento da resposta primária contra esta bactéria, prejudicando sua eliminação. Isto, porém, permanece uma especulação, pois não analisamos marcadores de apoptose.

É interessante observar que a porcentagem de células CCR7+ diminuiu no grupo saudável e aumentou no grupo periodontite, independente da espécie bacteriana, e que as MDDCs pulsadas com *S. sanguinis* e *T. denticola* também exibiram diminuição da intensidade de fluorescência dessa molécula no grupo saudável e aumento no grupo periodontite. Esse resultado sugere que estas espécies bacterianas, não-patogênica ou patogênica, podem prejudicar a ativação e migração das DCs em indivíduos periodontalmente saudáveis. Isto poderia explicar a ausência de destruição tecidual periodontal em indivíduos não-susceptíveis a periodontite, já que a destruição periodontal tem sido associada ao desenvolvimento de uma resposta específica exagerada (Seymour, 1987; Séguier et al., 2000), resposta esta que depende do estímulo das DCs.

Pelo menos 700 espécies bacterianas colonizam a boca humana, sendo que 500 espécies foram identificadas no biofilme subgingival (Paster et al., 2006). Muitas espécies, a exemplo do *S. sanguinis*, são bactérias comensais que colonizam a cavidade oral tendo um relacionamento simbiótico com o hospedeiro. *P. gingivalis*,

*P. intermedia* e *T. denticola* são espécies patogênicas, componentes da microbiota indígena detectadas em baixos níveis no periodonto saudável comparados a periodontite. Assim, os resultados apresentados nesse estudo são consistentes com a noção de que para se promover uma defesa apropriada contra potenciais patógenos, o sistema imune de mucosas deve estar devidamente regulado. Antígenos capturados e apresentados às células T pelas células dendríticas, sob condições fisiológicas, podem induzir tolerância (Uhlir, Powrie, 2003). Em contraste, antígenos capturados pelas DCs no contexto da inflamação ou destruição tecidual, induzem uma ativação prolongada dos linfócitos T.

A periodontite crônica compartilha características similares com outras doenças infecciosas como, por exemplo, a sífilis causada pelo *Treponema pallidum* e a doença de Lyme causada pelo *Borrelia burgdorferi*. Entretanto, essas bactérias induzem a maturação completa das células dendríticas (Hertz et al., 2001; Suhonen et al., 2003), enquanto, segundo os resultados aqui apresentados, a diferenciação e maturação das MDDCs é dependente da susceptibilidade do hospedeiro a doença e não apenas da espécie bacteriana.

As diferenças entre indivíduos saudáveis e doentes na expressão dos marcadores e função de células dendríticas, em resposta aos lisados aqui estudados, sugerem que o padrão de resposta imune seja a base para a compreensão das diferentes susceptibilidades dos indivíduos à periodontite crônica. Estes resultados evidenciam que existe uma complexidade das relações entre sistema imune e bactérias periodontais. Tais observações devem ser consideradas em estratégias para modificar o padrão dessas interações, como as abordagens imunoterapêuticas contra a periodontite crônica.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo fornecem novas perspectivas em relação a um mecanismo imunobiológico envolvendo a susceptibilidade do hospedeiro à periodontite e um efeito distinto das diferentes bactérias da microbiota periodontal no estímulo da resposta imune. Nas células dendríticas dos indivíduos com saúde periodontal, o grau de diferenciação e maturação alcançado, juntamente com o perfil de citocinas produzido pelas células dendríticas e pelos linfócitos, sugerem um fenótipo promotor de tolerância nesses indivíduos, independente do estímulo ser patogênico ou não. Por outro lado, nas células dendríticas dos indivíduos com periodontite crônica, a diferenciação e maturação das células dendríticas, o perfil de citocinas detectado nos diferentes sobrenadantes e o aumento da proliferação dos linfócitos, sugerem um fenótipo promotor de respostas heterogêneas nesses indivíduos, o que pode explicar, pelo menos parcialmente, o desenvolvimento e progressão da doença.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996;383:787-93.
- Albandar JM, Brunelle JA, Kingman A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol*. 1999;70:13-29.
- Aoyagi T, Sugawara-Aoyagi M, Yamazaki K, Hara K. Interleukin 4 (IL-4) and IL-6-producing memory T-cells in peripheral blood and gingival tissue in periodontitis patients with high serum antibody titers to *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*. 1995;10(5):304-10.
- Ardavín C, Martínez del Hoyo G, Martín P, Anjuère F, Arias CF, Marín AR, et al. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol*. 2001;22(12):691-700.
- Aronrerk N, Pichyangkul S, Yongvanitchit K, Wisetchang M, Sa-ard-iam N, Sirisinha S, Mahanonda R. Generation of gingival T cell lines/clones specific with *Porphyromonas gingivalis* pulsed dendritic cells from periodontitis patients. *J Periodontal Res*. 2003;38(3):262-8.
- Bahn AN. Microbial potential in the etiology of periodontal disease. *J Periodontol*. 1970;41(11):603-10.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392:245-52.
- Barbuto JA, Ensina LF, Neves AR, Bergami-Santos P, Leite KR, Marques R, et al. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2004;53(12):1111-8.
- Bell D, Chomarat P, Broyles D, Netto G, Harb GM, Lebecque S, et al. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med*. 1999;190(10):1417-26.
- Berglundh T, Liljenberg B, Lindhe J. Some cytokine profiles of T-helper cells in lesions of advanced periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2002;29(8):705-9.
- Bonasio R, Scimone ML, Schaerli P, Grabie N, Lichtman AH, Von Andrian UH. Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat Immunol*. 2006;7(10):1092-1100.
- Brocker T, Riedinger M, Karjalainen K. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells

---

<sup>1</sup> De acordo com o Manual de Normatização de Dissertações e Teses da Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic, baseado no estilo Vancouver de 2007 e abreviatura dos títulos de periódicos em conformidade com o Index Medicus.

can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med*. 1997;185(3):541-50.

Brown LJ, Loe H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 1993;2:57-71.

Caufield PW, Dasanayake AP, Li Y, Pan Y, Hsu J, Hardin JM. Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infect Immun*. 2000;68(7):4018-23.

Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durandi I. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med*. 1994a;180:1263-72.

Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacket C, et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med*. 1996;184(2):695-706.

Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 1997;9(1):10-6.

Cirriuncione C, Pimpinelli N, Orlando L, Romagnoli P. Lamina propria dendritic cells express activation markers and contact lymphocytes in chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2002;73(1):45-52.

Coffman RL, Mocci S, O'Garra A. The stability and reversibility of Th1 and Th2 populations. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999;238:1-12.

Cohen N, Morisset J, Emilie D. Induction of tolerance by *Porphyromonas gingivalis* on APCs: a mechanism implicated in periodontal infection. *J Dent Res*. 2004;83(5):429-33.

Cong Y, Konrad A, Iqbal N, Hatton RD, Weaver CT, Elson CO. Generation of antigen-specific Foxp3-expressing CD4+ regulatory T cells by inhibition of APC proteasome function. *J Immunol*. 2005;174(5):2787-95.

Corinti S, Medaglini D, Cavani A, Rescigno M, Pozzi G, Ricciardi-Castagnoli P, et al. Human dendritic cells very efficiently present a heterologous antigen expressed on the surface of recombinant gram-positive bacteria to CD4+ T lymphocytes. *J Immunol*. 1999;163(6):3029-36.

Cury PR, Arsati F, Barbuto JAM, Magalhães MHC, Araújo VC, Araújo NS. Antigen-presenting cells in human immunosuppressive drug-induced gingival enlargement. *Special Care of Dentistry*. 2008b (in press).

Cury PR, Barbuto JA, Rodrigues AEA, Furuse C, Araújo VC, Araújo NS. Interstitial and Langerhans' dendritic cells in chronic periodontitis and gingivitis. *Braz Oral Res*. 2008a;22(3):258-63.

Cutler CW, Jotwani R. Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2004;35:135-57.

Cutler CW, Jotwani R, Palucka AK, Burkeholder S, Kraus ET, Banchereau J. Antigen-capture of the phagocytosis-resistant pathogen by dendritic cells. *J Leukocyte Biol*. 1998;E19(Suppl 2):60.

- Cutler CW, Jotwani R, Palucka AK, Davoust J, Bell D, Banchereau J. Evidence and a novel hypothesis for the role of dendritic cells and *Porphyromonas gingivalis* in adult periodontitis. *J Periodontal Res.* 1999;34:1-7.
- Cutler CW, Kalmar JR, Genco CA. Pathogenic strategies of the oral anaerobe, *Porphyromonas gingivalis*. *Trends Microbiol.* 1995;3(2):45-51.
- Darveau RP, Belton CM, Reife RA, Lamont RJ. Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 1998;66(4):1660-5.
- Darveau RP, Pham TT, Lemley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect Immun.* 2004;72(9):5041-51.
- Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S et al. Selective recruitment of immature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med.* 1998 July;188(2):373-86.
- Emingil G, Karaarslan F, Keskinoglu A, Coker I, Atilla G. Phenotypic and functional analysis of peripheral blood mononuclear cells in generalized aggressive and chronic periodontitis patients. *J Int Acad Periodontol.* 2001;3:87-94.
- Engering A, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Immune escape through C-type lectins on dendritic cells. *Trends Immunol.* 2002;23(10):480-5.
- Enk AH. Allergic contact dermatitis: understanding the immune response and potential for targeted therapy using cytokines. *Mol Med Today.* 1997;3:423-8.
- Flemmig TF. Periodontitis. *Annals Periodontol.* 1999;4(1):32-8.
- Fokkema SJ, Loos BG, Slegte C, van der Velden U. A type 2 response in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell cultures from periodontitis patients. *Clin Exp Immunol.* 2002;127(2):374-8.
- Fujihashi K, Yamamoto M, McGhee JR, Kiyono H. Type 1/ type 2 cytokine production by CD4+ T cells in adult periodontitis. *J Dent Res.* 1994;73:204.
- Geissmann F, Prost C, Monnet JP, Dy M, Brousse N, Hermine O. Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med.* 1998;187(6):961-6.
- Gemmell E, Carter CL, Hart DN, Drysdale KE, Seymour GJ. Antigen-presenting cells in human periodontal disease tissues. *Oral Microbiol Immunol.* 2002;17(6):388-93.
- Gemmell E, Grieco DA, Seymour GJ. The proportion of IL-4, IFN-gamma and IL-10 positive cells in *P. gingivalis*-specific T cell lines established from *P. gingivalis*-positive subjects. *Oral Microbiol Immunol.* 1999;14:267-74.
- Gemmell E, Seymour GJ. Modulation of immune responses to periodontal bacteria. *Curr Opin Periodontol.* 1994;28-38.
- Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13:17-34.

- Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. *Periodontol 2000*. 2007;43:14-40.
- Gomez RS, Da Costa JE, Loyola AM, De Araujo NS, De Araujo VC. Immunohistochemical study of linear gingival erythema from HIV-positive patients. *J Periodontol Res*. 1995;30(5):355-9.
- Grouard G, Risoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med*. 1997;185(6):1101-11.
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, Vries JE, Roncarolo MG. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997;389:737-42.
- Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:621-67.
- Haffajee AD, Japlit M, Bogren A, Kent Junior RL, Goodson JM, Socransky SS. Differences in the subgingival microbiota of Swedish and USA subjects who were periodontally healthy or exhibited minimal periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2005 Jan;32(1):33-9.
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994;5:78-111.
- Hamlet SM, Cullinan MP, Westerman B, Lindeman M, Bird PS, Palmer J, et al. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* in an Australian population. *J Clin Periodontol*. 2001; 28(12):1163-71.
- Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med*. 2001;194:769-79.
- Hertz CJ, Kiertscher SM, Godowski PJ, Bouis DA, Norgard MV, Roth MD, Modlin RL. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol*. 2001;166(4):2444-50.
- Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, et al. Signaling by Toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun*. 2001;69:1477-82.
- Homey BMC, Dieu-Nosjean A, Wiesenborn C, Massacrier JJP, Oldham D, Catron M, Upregulation of macrophage inflammatory protein-3  $\alpha$ /CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J. Immunol*. 2000;164:6621-32.
- Huang Q, Liu D, Majewski P, Schulte LC, Korn JM, Young RA et al. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):870-5.
- Inaba K, Granelli-Piperno C, Steinman RM. Dendritic cells induce T lymphocytes to release B cell-stimulating factors by an interleukin 2-dependent mechanism. *J Exp Med*. 1983;158(6):2040-57.

Inaba K, Turley S, Yamaide F, Iyoda T, Mahnke K, Inaba M et al. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J Exp Med*. 1998;188(11):2163-73.

Inaba K, Witmer MD, Steinman RM. Clustering of dendritic cells, helper T lymphocytes and histocompatible B cells during primary antibody responses in vitro. *J Exp Med*. 1984;160(3):858-76.

Inaba K, Young JW, Steinman RM. Direct activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells. *J Exp Med*. 1987;166(1):182-94.

Iwabuchi N, Takahashi N, Xiao JZ, Miyaji K, Iwatsuki K. *in vitro* Th1 cytokine-independent Th2 suppressive effects of bifidobacteria. *Microbiol Immunol*. 2007; 51(7):649-60.

Iwamoto M, Shinohara H, Miyamoto A, Okuzawa M, Mabuchi H, Nohara T et al. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *Int J Cancer*. 2003;104(1):92-7.

Janeway Junior CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20:197-216.

Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin-10 production, nonproliferating CD4 T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med*. 2000;192(9):1213-22.

Jotwani R, Cutler CW. Multiple dendritic cell (DC) subpopulations in human gingival and association of mature DCs with CD4+ T cells in situ. *J Dent Res*. 2003;82(9):736-41.

Jotwani R, Cutler CW. Fimbriated *Porphyromonas gingivalis* is more efficient than fimbria-deficient *P. gingivalis* in entering human dendritic cells *in vitro* and induces an inflammatory Th1 effector response. *Infect Immun*. 2004;72(3):1725-32.

Jotwani R, Palucka AK, Al-Quotub M, Nouri-Shirazi M, Kim J, Bell D et al. Mature dendritic cells infiltrate the T cell-rich region of oral mucosa in chronic periodontitis: *in situ*, *in vivo* and *in vitro* studies. *J Immunol*. 2001;167(8):4693-700.

Kaliński P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today*. 1999;20(12):561-7.

Kaliński P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN- $\gamma$  and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J Immunol*. 1999;162(6):3231-6.

Kelso A. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? *Immunol Today*. 1995;16(8):374-9.

Kinane DF, Demuth DR, Gorr SU, Hajishengallis GN, Martin MH. Human variability in innate immunity. *Periodontol* 2000. 2007;45:14-34.

- Kojima T, Yasui S, Ishikawa I. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* in adult periodontitis patients. *J Periodontol.* 1993;64(12):1231-7.
- Kyewski BA, Fathman CG, Rouse RV. Intrathymic presentation of circulating non-MHC antigens by medullary dendritic cells. An antigen-dependent microenvironment for T cell differentiation. *J Exp Med.* 1986;163(2):231-46.
- Lanzavecchia A. Dendritic cell maturation and generation of immune responses. *Haematologica.* 1999;84 Suppl EHA-4: 23-5.
- Lappin DF, MacLeod CP, Kerr A, Mitchell T, Kinane DF. Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. *Clin Exp Immunol.* 2001 Feb;123(2):294-300.
- Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev.* 2002 Jan;82(1):97-130.
- Lindhe J, Hamp SE, Löe H. Experimental periodontitis in the Beagle dog. *J Periodontol Res.* 1973;8(1):1-10.
- Lindhe J, Liljenberg B, Listgarten M. Some microbiological and histopathological features of periodontal diseases in man. *J Periodontol.* 1980;51(5):264-9.
- Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol.* 1965; 36:177-87.
- Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods.* 2000;243(1-2):147-54.
- Madianos PN, Papapanou PN, Sandros J. *Porphyromonas gingivalis* infection of oral epithelium inhibits neutrophil transepithelial migration. *Infection and immunity.* 1997; 65(10):3983-90.
- Mahanonda R, Sa-Ard-Iam N, Yongvanitchit K, Wisetchang M, Ishikawa I, Nagasawa T, Walsh DS, Pichyangkul S. Upregulation of co-stimulatory molecule expression and dendritic cell marker (CD83) on B cells in periodontal disease. *J Periodontol Res.* 2002;37(3):177-83.
- Mahanonda R, Pothiraksanon P, Sa-Ard-Iam N, Yamazaki K, Schifferle RE, Hirunpetcharat C et al. The effects of *Porphyromonas gingivalis* LPS and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* LPS on human dendritic cells in vitro, and in a mouse model in vivo. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2006;24(4):223-8.
- Maiden MF, Carman RJ, Curtis MA, Gillett IR, Griffiths GS, Sterne JA et al. Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases: laboratory markers based on the microbiological analysis of subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1990 Jan;17(1):1-13.
- Maldonado-López R, Smedt T, Michel P, Godfroid J, Pajak B, Heirman C et al. CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> and CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med.* 1999;189(3):587-92.
- Marsh PD. The significance of maintaining the stability of the natural microflora of the mouth. *Br Dent J.* 1991 Sept;171(6):174-7.

- Martin M, Katz J, Vogel SN, Michalek SM. Differential induction of endotoxin tolerance by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. *J Immunol*. 2001;167:5278-85.
- McAdam AJ, Schweitzer AN, Sharpe AH. The role of B7 costimulation in activation and differentiation of CD4 and CD8 T cells. *Immunol Rev*. 1998;165:231-47.
- Mochizuki S, Kobayashi M, Suzuki T, Oikawa A, Koseki T, Nishihara T et al. Gamma-interferon enhances expression of CD14/MyD88 and subsequent responsiveness to lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*. 2004 Oct;39(5):333-43.
- Offenbacher S. Periodontal diseases. *Annals Periodontol*. 1996;1:821-78.
- O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*. 1998;8:275-83.
- Ogawa T, McGhee ML, Moldoveanu Z, Hamada S, Mestecky J, McGhee JR, Kiyono H. Bacteroides-specific IgG and IgA subclass antibody-secreting cells isolated from chronically inflamed gingival tissues. *Clin Exp Immunol*. 1989;76(1):103-10.
- Olweus J, BitMansour A, Warnke R, Thompson PA, Carballido J, Picker LJ et al. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(23):12551-56.
- Page RC. Current understanding of the aetiology and progression of periodontal disease. *Int Dent J*. 1986;36(3):153-61.
- Page RC. Periodontal diseases: a new paradigm. *J Dent Educ*. 1998;62(10):812-21.
- Palucka KA, Taquet N, Sanchez-Chapuis F, Gluckman JC. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol*. 1998;160(9):4587-95.
- Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000*. 2006;42:80-7.
- Podmore M, Ebersole JL, Kinane DF. Immunodominant antigens in periodontal disease: a real or illusive concept? *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001;12:179-85.
- Porcelli SA, Modlin RL. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annual Rev Immunol* 1999;17:297-329.
- Powell JD, Ragheb JA, Kitagawa-Sakakida S, Schwartz RH. Molecular regulation of interleukin-2 expression by CD28 co-stimulation and anergy. *Immunol Rev*. 1998;165:287-300.
- Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzadeh M, Van Dyke T, Banchereau J. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol*. 2001;167(9):5067-76.
- Pulendran B, Smith JL, Caspary G, Brasel K, Pettit D, Maraskovsky E. Distinct dendritic cells subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(3):1036-41.
- Reid CD, Fryer PR, Clifford C, Kirk A, Tikerpae J, Knight SC. Identification of hematopoietic progenitors of macrophages and dendritic Langerhans cells (DL-CFU) in human bone marrow and peripheral blood. *Blood*. 1990;76:1139-49.

- Reis SC. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(6):476-83.
- Res P, Martínez-Cáceres E, Jaleco AC, Staal F, Noteboom E, Weijer K et al. CD34+ CD38<sup>dim</sup> cells in the human thymus can differentiate into T, natural killer, and dendritic cells but are distinct from pluripotent stem cells. *Blood*. 1996;87(12):5196-5206.
- Rescigno M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. Molecular events of bacterial-induced maturation of dendritic cells. *J Clin Immunol*. 2000;20:161-6.
- Rescigno M, Martino CL, Sutherland MR, Gold, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med*. 1998;188:2175.
- Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, Waal Malefyt R et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science*. 1999 Feb 19;283(5405):1183-6.
- Romani N, Holzmann S, Tripp CH, Koch F, Stoitzner P. Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *APMIS*. 2003;111(7-8):725-40.
- Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kämpgen E, Eibl B et al. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods*. 1996;196(2):137-51.
- Sallusto F. Origin and migratory properties of dendritic cells in the skin. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2001;1(5):441-8.
- Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med*. 1995;182:389-400.
- Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med*. 1995 Aug 1;182(2):389-400.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev*. 2000 Oct;177:134-40.
- Salvi GE, Brown CE, Fujihashi K, Kiyono H, Smith FW, Beck JD, Offenbacher S. Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. *J Periodontol Res*. 1998;33(4):212-25.
- Saxon A, Feldhaus J, Robins RA. Single step separation of human T and B cells using AET treated red cells. *J Immunol Methods*. 1976;90:285-9.
- Seguier S, Bodineau A, Godeau G, Pellat B, Brousse N. Langerin+ versus CD1a+ Langerhans cells in human gingival tissue: a comparative and quantitative immunohistochemical study. *Arch Oral Biol*. 2003;48(4):255-62.
- Seguier S, Godeau G, Brousse N. Collagen fibers and inflammatory cells in healthy and diseased human gingival tissues: a comparative and quantitative study by immunohistochemistry and automated image analysis. *J Periodontol*. 2000a; 71(7):1079-85.

Seguier S, Godeau G, Brousse N. Immunohistochemical and morphometric analysis of intra-epithelial lymphocytes and Langerhans cells in healthy and diseased human gingival tissues. *Arch Oral Biol.* 2000b;45(6):441-52.

Seguier S, Godeau G, Leborgne M, Pivert G, Brousse N. Quantitative morphological analysis of Langerhans cells in healthy and diseased human gingival. *Arch Oral Biol.* 2000c;45(12):1073-81.

Seymour GJ. Possible Mechanisms Involved in the Immunoregulation of Chronic Inflammatory Periodontal Disease. *J Dent Res.* 1987;66:2-9.

Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontol Scand.* 2001;59:167-73.

Seymour GJ, Gemmell E, Reinhardt RA, Eastcott J, Taubman MA, Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanisms. *J Periodontal Res.* 1993;28:478-86.

Shenker BJ, Listgarten MA, Taichman NS. Suppression of human lymphocyte responses by oral spirochetes: a monocyte-dependent phenomenon. *J Immunol.* 1984;132:2039-45.

Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(3):151-61.

Sieling PAD, Jullien M, Dahlem TF, Tedder TH, Rea RL, Modlin et al. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. *J Immunol.* 1999;162:1851- 8.

Sigusch B, Klinger G, Glockmann E, Simon HU. Early-onset and adult periodontitis associated with abnormal cytokine production by activated T lymphocytes. *J Periodontol.* 1998;69(10):1098-1104.

Slots J, Dahlé G. Subgingival microorganisms and bacterial virulence factors in periodontitis. *Scand J Dent Res.* 1985;93(2):119-27.

Slots J, Genco RJ. Microbial patogenicity. Black pigmented bacteroides species, capnocytophaga species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival and tissue destruction. *J Dent Res.* 1984;63(3):412-21.

Slots J. The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. *Scand J Dent Res.* 1977;85(2):114-21.

Snyderman R. Role for endotoxin and complement in periodontal tissue destruction. *J Dent Res.* 1972;51(2):356-61.

Socransky SS, Haffajee AD, Ximenez-Fyvie LA, Ferez M, Mager D. Ecological considerations in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* periodontal infections. *Periodontol* 2000. 1999;20:341-62.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25(2):134-44.

Socransky SS, Haffajee AD, Goodson JM, Lindhe J. New concepts of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1984;11(1):21-32.

Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000*. 1994;5:7-25.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*. 2005;38:135-87.

Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol*. 1992;63(4):322-31.

Socransky SS. Microbiology of periodontal disease - present status and future considerations. *J Periodontol*. 1977;48(9):497-504.

Socransky SS. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J Dent Res*. 1970;49(2):203-22.

Sporri R, Reis SC. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4<sup>+</sup> T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol*. 2005;6:163-70.

Steinbrink K, Wolfi M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10 treated dendritic cells. *J Immunol*. 1997;159:4772-80.

Steinman RM, Adams JC, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J Exp Med*. 1975 Apr 1;141(4):804-20.

Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973;137:1142.

Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med*. 1974 Feb 1;139(2):380-97.

Steinman RM, Kaplan G, Witmer MD, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med*. 1979 Jan;149(1):1-16.

Steinman RM, Lustig DS, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. III. Functional properties in vivo. *J Exp Med*. 1974;159:1431.

Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(1):351-8.

Stenger S, Niazi KR, Modlin RL. Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 1998 Oct;161(7):3582-8.

Suhonen J, Komi J, Soukka J, Lassila O, Viljanen MK. Interaction between *Borrelia burgdorferi* and immature human dendritic cells. *Scand J Immunol*. 2003;58(1):67-75.

Suri-payer E, Amar AZ, Thornthorn AM, Shevach EM. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol*. 1998;160(3):1212-8.

- Susin C, Vacchia CFD, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar J. Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effects of demographic, behavioral and environmental risk indicators. *J Periodontol.* 2004;75(7):1033-41.
- Svensson M, Maroof A, Ato M, Kaye PM. Stromal cells direct local differentiation of regulatory dendritic cells. *Immunity.* 2004;21(6):805-16.
- Takeichi O, Haber J, Kawai T, Smith DJ, Moro I, Taubman MA. Cytokine profiles of T-lymphocytes from gingival tissues with pathological pocketing. *J Dent Res.* 2000;79:1548-55.
- Takeuchi Y, Umeda M, Sakamoto M, Benno Y, Huang Y, Ishikawa Y. *Treponema socranskii*, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2001;72(10):1354-63.
- Tanaka H, Demeure CE, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M. Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio. *J Exp Med.* 2000;405-12.
- Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Asford C, Cao T, Matsui T et al. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev.* 2007;219:118-42.
- Uhlir HH, Powrie F. Dendritic cells and the intestinal bacterial flora: a role for localized mucosal immune responses. *J Clin Invest.* 2003;112:648-51.
- Urban BC, Ferguson DJ, Pain A. *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature.* 1999;400:73-7.
- Van Overtvelt L, Vanderheyde N, Verhasselt V. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. *Infect Immun.* 1999 Aug;67(8):4033-40.
- Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breittmayer JP, Cottrez F, Groux H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity.* 2003;18(5):605-17.
- Wang B, Zhuang L, Fujisawa H, Shinder GA, Feliciani C, Shivji GM et al. Enhanced epidermal Langerhans cell migration in IL-10 knockout mice. *J Immunol.* 1999;162(1):277-83.
- Wassenaar A, Reinhardus C, Thepen T, Abraham-Inpijn L, Kievits F. Cloning, characterization, and antigen specificity of T-lymphocyte subsets extracted from gingival tissue of chronic adult periodontitis patients. *Infect Immun.* 1995;63(6):2147-53.
- Yamamoto M, Fujihashi K, Hiroi T, McGhee JR, Van Dyke TE, Kiyono H. Molecular and cellular mechanisms for periodontal diseases: role of T helper type 1 and Th2 type cytokines in induction of mucosal inflammation. *J Periodontal Res.* 1997;32:115-9.
- Yamazaki K, Nakajima T, Hara K. Immunohistological analysis of T cell functional subsets in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Exp Immunol.* 1995;99:384-91.

Yoshimura A, Kaneko T, Kato Y, Golenbock DT, Hara Y. Lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* are antagonists for human toll-like receptor 4. *Infect Immun*. 2002;70:218-25.

Yun PL, Decarlo AA, Collyer C, Hunter N. Hydrolysis of interleukin-12 by *Porphyromonas gingivalis* major cysteine proteinases may affect local gamma interferon accumulation and the Th1 or Th2 T-cell phenotype in periodontitis. *Infect Immun*. 2001;69(9):5650-60.

Zhou LJ, Tedder TF. CD14<sup>+</sup> blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83<sup>+</sup> dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Mar;93(6):2588-92.

**ANEXO A - Folha de Aprovação do Comitê de Ética**

Aprovado pelo CEP

Campinas, 10 de Dezembro de 2.004.

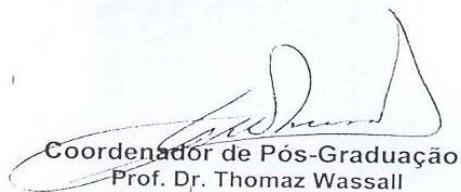
A(o)

Prof(a) Dr(a). Patricia Ramos Cury

O projeto de sua autoria " Efeitos de bactérias da microbiota periodontal na diferenciação e função das células dendríticas humana in vitro "

Entregue na Secretaria de Pós-graduação do CPO - São Leopoldo Mandic, no dia 01/12/04, com número de protocolo nº 05/266, foi APROVADO pelo comitê de Ética e Pesquisa instituído nesta Universidade de acordo com a resolução 196 / 1.996 do CNS – Ministério da Saúde, em reunião realizada no dia 05/12/2004.

Cordialmente



Coordenador de Pós-Graduação  
Prof. Dr. Thomaz Wassall

## **ANEXO B - Termo de Consentimento**

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### CARTA DE INFORMAÇÃO AOS VOLUNTÁRIOS

Prezado(a) Sr(a):

1 - O título da minha pesquisa é “Efeitos de bactérias da microbiota periodontal na diferenciação e função das células dendríticas humanas in vitro”

O sistema imune é composto por diversas células distribuídas por todo o corpo que são responsáveis pelas defesas contra vírus, bactérias e tumores. Desta forma, o sistema imune pode atuar no controle das doenças da gengiva.

Dentre as células envolvidas na defesa do organismo, estão as células dendríticas.

2 - A Profa. Dra Patricia Ramos Cury é a responsável pela pesquisa.

Seu contato profissional é:

**Faculdade e Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic**

R. José Rocha Junqueira, 13  
patriciacury@slmandic.com.br  
13045-755 - Campinas - SP  
Tel.: (19) 3211-3600

3 - Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa avaliar a função e os aspectos externos de suas células dendríticas frente a estímulos por bactérias que causam doença gengival.

4 - Para participação nesta pesquisa, o(a) senhor(a) responderá a um questionário sobre sua saúde geral e será avaliado(a) por um Cirurgião-Dentista utilizando uma pequena régua que permite a medida da gengiva ao redor dos dentes. Em seguida, uma parte do sangue que o senhor está doando e que, normalmente, é descartada será usada para a pesquisa. Usaremos apenas essa parte que não seria aproveitada para nada.

Nenhum outro procedimento, nem qualquer outra participação serão necessários.

5 - Desconfortos e riscos: nenhum risco ocorrerá devido aos procedimentos de exame da sua gengiva. O exame da gengiva pode causar algum desconforto e um pequeno sangramento apenas quando existe inflamação gengival, similar ao que acontece quando o(a) senhor(a) escova os dentes. O sangramento é pequeno e pára espontaneamente.

6 - Benefícios: o senhor terá a oportunidade de conhecer as condições da sua gengiva, de ser orientado a procurar um profissional para o tratamento e de contribuir para a evolução das pesquisas sobre as doenças da gengiva.

7 - Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas através do endereço acima.

9 - Sua participação no estudo é voluntária, e é garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer tipo de prejuízo.

10 - As informações obtidas no seu exame serão analisadas em conjunto com a de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

11 - O(a) senhor(a) tem direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais do estudo.

13 - Não há despesas pessoais para o(a) senhor(a). Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

14 - Existe o compromisso do pesquisador de utilizar os resultados dos exames somente para esta pesquisa e para publicação da pesquisa em revista científica.

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por este instrumento particular declaro, para efeitos éticos e legais, que eu (nome)....., (nacionalidade)....., (profissão)....., R.G:....., CIC....., residente e domiciliado(a)....., na cidade de ..... estado....., fui informado dos objetivos, procedimentos, riscos e benefícios desta pesquisa, descritos acima. Entendo que terei garantia de confidencialidade, ou seja, que apenas dados consolidados serão divulgados e ninguém além dos pesquisadores terá acesso aos nomes dos participantes desta pesquisa. Entendo também, que tenho direito a receber informações adicional sobre o estudo a qualquer momento, mantendo contato com o pesquisador principal. Fui informado ainda, que a minha participação é voluntária e que se eu preferir não participar ou deixar de participar deste estudo em qualquer momento, isso NÃO me acarretará qualquer tipo de penalidade.

Compreendendo tudo o que me foi explicado sobre o estudo a que se refere este documento, concordo em participar do mesmo.

Por estar de acordo com o teor do presente termo, assino abaixo o mesmo.

Campinas, ..... de..... de 200....

.....

Assinatura do voluntário ou Responsável

.....

Assinatura do pesquisador

## ANEXO C - Tabelas de Resultados

Número de células positivas (Eventos), porcentagem de células positivas (%) e intensidade de fluorescência (MIF) para as moléculas de membrana HLA-DR, CD11c, CD14, CD80, CD86, CD83, CD1a, CCR7 e CD123 das MDDCs tratadas com *S. sanguinis*. E = erro padrão da média.

		<i>Streptococcus sanguinis</i>											
		Saudável		Periodontite		Saudável		Periodontite		Saudável		Periodontite	
		Eventos	E	Eventos	E	%	E	%	E	MIF	E	MIF	E
HLA-DR	controle	3153	660.3	3856	842.8	74	7.7	72	9.9	91	33.9	91	28.3
	tratamento	4482	1361.8	2984	863.9	73	8.1	56	12.8	75	31.1	137	76.9
CD11c	controle	3267	717.7	3465	789.5	78	7.1	55	5.2	129	55.3	127	25.9
	tratamento	4040	845.4	2949	548.6	76	8.8	47	11.2	106	53.1	82	15.9
CD14	controle	919	268.6	1302	256.0	29	10.2	23	3.3	12	2.5	3	0.4
	tratamento	609	222.7	491	108.3	14	4.3	27	8.7	16	2.9	6	3.6
CD80	controle	860	344.6	1460	362.8	22	9.0	31	9.5	24	2.7	26	2.2
	tratamento	2333	1306.0	1148	501.9	33	9.9	21	10.2	20	1.4	26	2.7
CD86	controle	1572	273.1	2325	722.0	41	9.3	57	7.9	110	32.5	82	37.8
	tratamento	1948	620.0	1819	198.3	60	17.9	4	0.3	167	61.6	47	24.4
CD83	controle	482	83.8	1025	359.6	13	3.7	19	7.2	24	3.9	28	2.4
	tratamento	612	42.7	739	296.0	13	3.9	13	5.7	22	2.8	32	3.5
CD1a	controle	2834	1144.1	1839	378.0	52	15.3	41	5.6	81	47.3	68	17.2
	tratamento	3498	1103.2	2070	426.1	53	15.1	35	8.8	100	15.3	72	24.3
CCR7	controle	1371	853.3	1433	449.3	38	13.6	28	8.5	25	3.5	29	4.6
	tratamento	568	372.6	1294	547.8	28	13.2	32	8.2	22	3.3	34	5.0
CD123	controle	1301	439.1	2954	516.6	35	13.2	49	3.4	33	4.1	62	18.3
	tratamento	1416	2116.0	2329	528.8	61	8.6	43	5.1	24	2.9	39	8.3

Número de células positivas (Eventos), porcentagem de células positivas (%) e intensidade de fluorescência (MIF) para as moléculas de membrana HLA-DR, CD11c, CD14, CD80, CD86, CD83, CD1a, CCR7 e CD123 das MDDCs tratadas com *P. gingivalis*. E = erro padrão da média.

		<i>Porphyromonas gingivalis</i>											
		Saudável		Periodontite		Saudável		Periodontite		Saudável		Periodontite	
		Eventos	E	Eventos	E	%	E	%	E	MIF	E	MIF	E
HLA-DR	controle	3153	660.3	3856	842.8	74	7.7	71	9.9	90	33.9	91	28.3
	tratamento	3985	1178.8	3861	1271.9	73	4.4	63	15.6	112	39.1	141	73.2
CD11c	controle	3268	717.7	3465	789.5	76	7.1	63	5.2	129	55.3	127	25.9
	tratamento	4081	696.8	2961	769.3	71	6.8	54	11.7	127	47.6	164	57.0
CD14	controle	919	268.6	1302	256.0	29	10.2	23	3.3	12	2.5	3	0.4
	tratamento	683	254.8	1484	368.4	24	8.9	23	7.1	12	3.4	7	1.2
CD80	controle	860	344.6	1460	362.8	22	9.0	31	9.5	24	2.7	26	2.2
	tratamento	2321	813.0	1970	490.6	34	12.8	33	6.6	21	2.6	28	5.4
CD86	controle	1572	273.1	2325	722.0	41	9.3	49	7.9	110	32.5	62	37.8
	tratamento	4169	1244.7	2387	515.0	61	15.9	37	13.4	48	16.3	44	23.5
CD83	controle	482	83.8	938	359.6	13	3.7	19	7.2	24	3.9	28	2.4
	tratamento	655	126.7	1219	506.2	12	2.5	22	7.4	21	2.1	29	3.3
CD1a	controle	2834	1144.1	1839	378.0	52	15.3	41	5.6	81	47.3	68	17.2
	tratamento	2933	169.8	1364	539.0	51	15.6	24	23.8	90	15.4	64	25.5
CCR7	controle	1868	853.3	1433	449.3	38	13.6	28	8.5	25	3.5	29	4.6
	tratamento	909	287.1	1648	520.1	23	13.4	32	11.6	28	7.6	28	3.8
CD123	controle	1301	439.1	2954	516.6	35	13.2	49	3.4	33	4.1	62	18.3
	tratamento	1734	563.9	2842	777.5	49	20.6	37	12.8	35	7.0	48	25.8

Número de células positivas (Eventos), porcentagem de células positivas (%) e intensidade de fluorescência (MIF) para as moléculas de membrana HLA-DR, CD11c, CD14, CD80, CD86, CD83, CD1a, CCR7 e CD123 das MDDCs tratadas com *P. intermedia*. E = erro padrão da média

<i>Prevotella intermedia</i>													
		Saudável		Periodontite		Saudável		Periodontite		Saudável		Periodontite	
		Eventos	E	Eventos	E	%	E	%	E	MIF	E	MIF	E
HLA-DR	controle	3153	660.3	3856	842.8	74	7.7	71	9.9	90	33.9	91	28.3
	tratamento	1095	280.7	2569	1254.3	48	10.0	50	17.5	83	33.5	150	144.3
CD11c	controle	3268	717.7	3465	789.5	76	7.1	63	5.2	129	55.3	127	25.9
	tratamento	1905	277.6	3710	1073.6	67	9.4	64	5.0	118	50.0	143	19.9
CD14	controle	919	268.6	1302	256.0	29	10.2	23	3.3	12	2.5	3	0.4
	tratamento	450	86.2	1866	283.2	13	5.0	25	3.6	22	3.6	8	3.2
CD80	controle	860	344.6	1460	362.8	22	9.0	31	9.5	24	2.7	26	2.2
	tratamento	567	117.0	1707	794.4	15	4.8	37	7.8	21	2.3	58	17.4
CD86	controle	1572	273.1	2325	722.0	41	9.3	49	7.9	110	32.5	62	37.8
	tratamento	1280	423.2	1153	343.1	49	18.7	31	8.1	172	13.6	84	56.4
CD83	controle	482	83.8	938	359.6	13	3.7	19	7.2	24	3.9	28	2.4
	tratamento	401	115.7	590	498.5	14	4.1	10	1.4	33	3.8	29	3.0
CD1a	controle	2834	1144.1	1839	378.0	52	15.3	41	5.6	81	47.3	68	17.2
	tratamento	1461	245.3	2172	1685.5	43	19.4	9	5.8	103	8.1	77	49.3
CCR7	controle	1868	853.3	1433	449.3	38	13.6	28	8.5	25	3.5	29	4.6
	tratamento	452	263.6	2155	636.0	13	13.0	42	4.6	25	3.6	42	3.4
CD123	controle	1301	439.1	2954	516.6	35	13.2	49	3.4	33	4.1	62	18.3
	tratamento	1022	575.2	1575	1427.2	44	20.5	32	5.7	35	8.1	48	8.8

Número de células positivas (Eventos), porcentagem de células positivas (%) e intensidade de fluorescência (MIF) para as moléculas de membrana HLA-DR, CD11c, CD14, CD80, CD86, CD83, CD1a, CCR7 e CD123 das MDDCs tratadas com *T. denticola*. E = erro padrão da média.

		<i>Treponema denticola</i>											
		Saudável		Periodontite		Saudável		Periodontite		Saudável		Periodontite	
		Eventos	E	Eventos	E	%	E	%	E	MIF	E	MIF	E
HLA-DR	controle	3153	660.3	3856	842.8	74	7.7	71	9.9	90	33.9	91	28.3
	tratamento	3883	1195.3	3667	794.0	67	10.5	78	5.3	75	24.6	92	27.8
CD11c	controle	3268	717.7	3465	789.5	76	7.1	63	5.2	129	55.3	127	25.9
	tratamento	4368	1160.9	4118	748.7	79	4.8	81	6.1	155	43.4	104	22.5
CD14	controle	919	268.6	1302	256.0	29	10.2	23	3.3	12	2.5	3	0.4
	tratamento	68	46.5	219	11.0	1	0.9	5	1.3	12	1.1	13	5.0
CD80	controle	860	344.6	1460	362.8	22	9.0	31	9.5	24	2.7	26	2.2
	tratamento	1772	582.2	1108	197.5	38	10.9	27	10.7	13	5.7	25	9.8
CD86	controle	1572	273.1	2325	722.0	41	9.3	49	7.9	110	32.5	62	37.8
	tratamento	4994	1653.0	2274	157.0	99	23.6	69	42.0	158	17.2	42	11.7
CD83	controle	482	83.8	938	359.6	13	3.7	19	7.2	24	3.9	28	2.4
	tratamento	561	152.1	2605	1304.0	7	2.9	41	18.0	25	4.1	16	5.6
CD1a	controle	2834	1144.1	1839	378.0	52	15.3	41	5.6	81	47.3	68	17.2
	tratamento	1838	597.5	5030	520.0	65	24.9	59	17.2	39	12.7	136	33.9
CCR7	controle	1868	853.3	1433	449.3	38	13.6	28	8.5	25	3.5	29	4.6
	tratamento	1215	169.5	2508	607.5	14	5.9	86	3.0	23	5.5	32	1.3
CD123	controle	1301	439.1	2954	516.6	35	13.2	49	3.4	33	4.1	62	18.3
	tratamento	1266	149.0	3970	1185.5	31	13.1	66	2.4	27	10.8	37	18.9

**ANEXO D - Manuscrito submetido a publicação****The Effects of *Prevotella intermedia* Lysates on Human Dendritic Cell****Patricia Ramos Cury<sup>1</sup>****Verônica Vargas Horewicz<sup>1</sup>****João Paulo Martins do Carmo<sup>2</sup>****José Alexandre Marzagão Barbuto<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Periodontology, São Leopoldo Mandic Dental Research Center, Campinas, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

**Short title:** *Prevotella intermedia* effect on dendritic cell

**Key-words:** Dendritic cells, Immune response, Periodontal Disease, Oral Biofilm

**Number of words in the abstract:** 157

**Number of words in the text:** 2494

**Corresponding Author:**

Prof. Patricia Ramos Cury

R. Carlos Weber, 499, apt 151 A, São Paulo, SP, Brazil

Phone/fax: 55-11-93717018, E-mail: patcury@yahoo.com

## ABSTRACT

We investigated the effects of *P. intermedia* on phenotypic and functional changes in cultured human monocyte-derived dendritic cells (MDDCs). MDDCs from systemically and periodontally healthy subjects were pulsed with a *P. intermedia* preparation; untreated cells were used as a control. IL-12, IL-10 and IFN $\gamma$  were quantified in MDDC supernatants. MDDCs were co-cultured with allogeneic T cells and T cell proliferation was assessed. *P. intermedia* preparation affected MDDC differentiation, down-regulating HLA-DR, CD11c and CD1a mean fluorescence intensity (MFI) ( $p \leq 0.05$ ). CD80, CD86 and CD83 MFI presented a tendency for down-regulation in the bacteria treated-MDDCs, and the number of MDDCs positive for CD83 was decreased by the bacterial preparation ( $p = 0.05$ ). The bacterial preparation upregulated IL-10 production. Bacteria treated-MDDCs inhibited T cell proliferation ( $p = 0.05$ ). In conclusion, *P. intermedia* preparation down-regulates MDDC differentiation and maturation, and inhibits allogeneic T cell stimulation. Therefore, *P. intermedia* may decrease adaptive immune responses during the onset and progression of periodontitis.

## INTRODUCTION

Dendritic cells (DCs) are a class of specialized, antigen presenting cells (APCs) that not only can express peptide-MHC complexes for T cell recognition, but also may exhibit the additional capacity to deliver so-called, co-stimulatory signals to naive T cells, thus triggering T cell activation and the initiation of many adaptive immune responses. This process is referred to as the sensitizing function of DCs (Banchereau and Steinman, 1998).

Immature DCs that reside in peripheral tissues possess specialized capacities for internalizing and processing foreign antigens like the microbes that gain access to such sites, although they display little or no co-stimulatory activity. However, after internalizing foreign

antigens and receiving an activation signal, DCs migrate into organized lymphoid tissues, lose their ability to take up new antigens, and mature into potent APCs. By virtue of their capacity to respond directly to microbial stimuli and signals of innate immunity, and thus to acquire the capacity to interact with and stimulate T and B cell responses, DCs provide a central link between innate and adaptive immunity (Banchereau et al, 2000).

Monocyte-derived DCs (MDDCs), produced by culturing monocytes with granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-4 (IL-4) are phenotypically equivalent to the immature DCs that reside in peripheral tissues. When cultured in the presence of GM-CSF plus IL-4 (or IL-13), human CD14<sup>+</sup> monocytes differentiate into cells resembling immature DCs, showing potent antigen uptake and processing capability (Schreurs et al, 1999). On subsequent exposure to microbial products like lipopolysaccharide (LPS), cytokines, or signals mimicking contact with T cells, these DCs mature into cells exhibiting potent sensitizing functions (Sallusto and Lanzavecchia, 1994).

Periodontal diseases are characterized by chronic inflammatory lesions and destruction of the supporting periodontal tissues (Socransky et al, 1998). *Prevotella intermedia*, a Gram-negative anaerobe specie, has been implicated as a putative periodontal pathogen owing to its isolation in lesions from patients with early and advanced periodontitis (Haffajee and Socransky, 1994). While, most living or killed microbes and microbial antigens induce maturation of human dendritic cell, the effects of *P. intermedia* are unknown.

The present study investigates the effects of *Prevotella intermedia* preparation on the phenotype and function of MDDCs to better understand the role of APCs, which are clearly essential to the regulation and maintenance of local T cell responses in periodontitis lesions.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Bacterial Preparation**

*P. intermedia* (ATCC 49046) was cultured for 14 days in blood agar (Vetec, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) supplemented with hemin (5 µg/mL), menadione (0.5 µg/mL) and whole sheep blood (5% [vol/vol]) at 37°C in an anaerobic jar (Permutation, Curitiba, PR, Brazil) with an anaerobic atmosphere-generating system (Anaerogen, Oxoid, Unipath Inc., Nepean, Ontario, Canada). After the bacterial growth phase, bacterial lysates were prepared. Briefly, the bacteria were harvested by centrifugation at 500 x g for 2 min and the supernatant was discarded. The bacterial pellet was re-suspended in sterile Milli-Q water and then lysed by heating to 100°C for 10 min (Iwabuchi et al., 2007). The protein concentration of the extracts was then measured (Protein Assay Kit, MRC - Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA), and the bacterial preparation was then aliquoted and stored at -20°C until use.

### **DC Preparation**

The study protocol was approved by the Institutional Ethics Committee. Peripheral blood was obtained from a local blood bank (Hemocentro, State University of Campinas, São Paulo, Brazil). Standard buffy coat samples were prepared from 4 systemically and periodontally healthy donors. Written informed consent was obtained from each volunteer.

Human monocytes were isolated using Ficoll-paque Plus (Amersham Bioscience do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brazil) density gradient centrifugation method (Reis et al, 2008).

The isolated monocytes were allowed to adhere to a plastic surface by plating  $5 \times 10^6$  cells/mL in RPMI 1640 medium (Gibco™, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco™, Grand Island, NY, USA) (R-10) for 2 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Adherent monocytes were then cultured for 5 days in R-10 medium

supplemented with 50 ng recombinant GM-CSF (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) and IL-4 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) per mL. On day 4, 50 ng/mL GM-CSF and IL-4 were added to the medium and the DCs were either left untreated (control MDDCs) or treated with bacterial preparation in three concentrations: 5, 10 or 15 µg/mL for a dose-response analysis. Subsequently, on day 5, the medium was supplemented with 50 ng/mL recombinant human TNF-alpha (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA).

### **Flow Cytometry**

On day 7, the MDDC yield and surface marker expression were assessed. Bacteria-pulsed MDDCs and control MDDCs ( $10^5$  cells) were examined by triple or quadruple immunofluorescence staining with PE, FITC, CY-5 or CY-7-conjugated monoclonal antibodies (MoAbs) specific for CD80, CD83, CD11c, HLA-DR, CD86, CD14, CCR7 and CD1a (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). After 20-min antibody incubation at 4 °C and washing, the cells were fixed in 2% paraformaldehyde/PBS plus 0.5% BSA (Bovine Serum Albumin; Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA).

Cell acquisition was performed in a FACSCalibur flow cytometer and analysis was carried out using a CellQuest software (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA). Cells exhibiting the phenotype defined as HLA-DR<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-low</sup>, gated for size (forward scatter, FSC) and granularity (side scatter, SSC) in a range that excluded dead cells and debris, were regarded as MDDCs and the mean fluorescence intensity (MFI) was analyzed.

### **Lymphocyte preparation and T cell proliferation assay**

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated by rosetting with AET (2-aminoethylisothiuronium bromide hydrobromide; Sigma, St Louis, MO, USA)-treated sheep red blood cells. Either bacteria-treated or untreated DCs ( $10^5$  DCs) were irradiated (1250 rad,

15 min) and cultured with a constant ratio (1:30) of allogeneic CFSE-labeled T cells ( $3 \times 10^6$  T cells) in a 96-well-round bottom, tissue culture plate for 7 days. T cell proliferation was assessed by analysis of CFSE (CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester; Sigma®, Saint Louis, MO, USA) fluorescence intensity in a Flow Cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson, Mountain View, CA).

T cell proliferation in response to phytohemagglutinin (PHA; Sigma®, Saint Louis, MO, USA) was used as a positive control.

### **Quantitation of IL-12, IL-10 and IFN $\gamma$**

Day-4 MDDCs were either left untreated (control MDDCs) or incubated for 48 h with bacterial preparation at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and IFN $\gamma$ , IL-12 and IL-10 were measured in culture supernatants by ELISA using commercially available kits (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions.

### **Statistical analysis**

Student's paired t-test was used to evaluate the effect of the bacterial preparation on the expression of the different molecules, cytokine expression and T cell proliferation. Significance was set at 5%.

## **RESULTS**

### **MDDC differentiation and maturation**

*Prevotella intermedia* preparation decreased 2.7-fold the percentage of cells of greater size (FSC) and granularity (SSC) compared to the control ( $p = 0.05$ ) (Figure 1).

The effect of *P. intermedia* lysates on MDDCs was evaluated by exposing differentiated MDDCs to the different bacterial preparation concentrations (5, 10 and 15

$\mu\text{g/mL}$ ) *in vitro* (data not shown). At 10  $\mu\text{g/mL}$  the *P. intermedia* preparation significantly affected HLA-DR and CD11c expression, and this dose was thus used in further experiments.

*P. intermedia* preparation affected MDDC differentiation, down-regulating HLA-DR and CD11c expression ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 2). Staining for the monocyte/macrophage marker CD14 was slight or negative and was not affected by the *P. intermedia* preparation.

*P. intermedia* preparation down-regulated MDDC activation or maturation, decreasing the number of MDDCs positive for CD83 ( $p = 0.05$ ). In the same way, CD80 and CD86 expression (co-stimulatory molecules) showed a tendency for reduction in the bacteria-treated (MFI  $\pm$  standard error- CD80:  $22.25 \pm 2.39$ , CD86:  $65.09 \pm 18.55$ ) compared to untreated cells (CD80:  $26.57 \pm 2.61$ , CD86:  $131.05 \pm 46.22$ ) (Figure 2).

Staining for chemokine receptor associated with tissue trafficking CCR7 was not significantly affected by the *P. intermedia* preparation ( $p = 0.4$ ).

CD1a expression (molecule associated to MDDC capacity to present microbial antigen to T cells) was down-modulated in the presence of the bacterial preparation ( $p = 0.05$ ) (Figure 2).

### **T cell Proliferation**

After 7 days of co-culture, a 0.66 ( $\pm 0.16$ )-fold inhibition of allogeneic T cell proliferation was induced by *P. intermedia*-pulsed MDDCs compared to control MDDCs ( $p = 0.05$ ) (Figure 3).

### **IFN $\gamma$ , IL-10 and IL-12 expressions**

Supernatants of MDDC cultures were analyzed after 48 h of stimulation by *P. intermedia*. IL-12 and IFN $\gamma$  levels were not affected significantly by bacterial preparation. However, IL-10 production was upregulated ( $333.51 \pm 41.54$  pg/mL,  $p = 0.05$ ) (Figure 4).

Control MDDCs produced IL-10 (mean  $\pm$  standard error:  $228.69 \pm 59.51$  pg/mL) and IFN $\gamma$  ( $21.17 \pm 14.26$  pg/mL), while IL-12 was not detectable.

## DISCUSSION

Numerous factors regulate DC maturation, including pathogen-related molecules such as LPS, bacterial DNA and double-strand RNA. These factors influence the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory signals in the infection microenvironment and T cell-derived signals (Banchereau et al., 2000), and thus affect the course of many diseases. We show here that preparation of *P. intermedia* influence MDDC differentiation, maturation and function. Firstly, the bacterial preparation induced a reduction in the percentage of large-sized cells of greater granularity. Secondly, MDDC differentiation and maturation were reduced. Finally, allogeneic T cell proliferation was inhibited by *P. intermedia*-treated MDDCs.

Maturation of MDDCs involves morphological and molecular changes. Immature MDDCs are medium-sized, highly phagocytic cells. During the course of maturation, cytoplasmic volume and granularity increase, phagocytic activity decreases and cell surface expression of MHC class II (HLA-DR), CD83 and co-stimulatory molecules such as CD80 and CD86 increases, which enables antigen presentation to naive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, promoting the adaptive immune response (Banchereau and Steinman, 1998; Banchereau et al., 2000; Porcelli and Modlin, 1999; Lanzavecchia, 1999). Thus, *P. intermedia* down-regulates MDDC maturation, decreasing the population of cells of larger size and greater granularity, HLA-DR and CD11c expression and decreasing expression of co-stimulatory molecules. Although most living or killed microbes as well as a wide variety of purified microbial antigens induce maturation of human DCs (Huang et al., 2001; Rescigno et al., 2000; They and Amigorena, 2001), some microbes, including the parasites *Plasmodium malariae* and

*Trypanosoma cruzi* inhibit this process (Urban et al., 1999; Van Overtvelt et al., 1999). The mechanisms used by *P. intermedia* to affect MDDC phenotype may be regulated via a Toll-like receptor mediated pathway, which need to be investigated. The reduction of the population of cells of larger size and greater granularity may indicate a cytotoxic effect of *P. intermedia* on MDDCs.

CD1 molecules constitute a separate lineage of MHC-like molecules that function in binding and presenting lipid antigens to T cells (Porcelli and Modlin, 1999). Thus, the down-regulation of CD1a, as demonstrated here, suggests that the *P. intermedia* preparation reduces the uptake and presentation of this antigen. Similarly, CD1a down-regulation has been reported in MDDCs infected with virulent *Mycobacterium tuberculosis* (Stenger et al., 1998). These data suggest that a tolerogenic MDDC phenotype may be induced by *P. intermedia*. However, as CCR7 expression was not affected by the *P. intermedia*, these cells may be able to traffic to T-cell areas but do not properly present antigens.

MDDC function was also significantly down-regulated by *P. intermedia* preparation, which may be related to the reduced proliferative response of peripheral blood mononuclear cells from periodontitis patients (Emingil et al., 2001) and the predominance of B cells rather than T cells in progressive periodontitis (Gemmell et al., 2002). Similar to our findings, it has been shown that allogeneic and autologous T cells isolated from gingival tissue do not proliferate in response to *P. intermedia*-pulsed DCs (Aroonrerk et al., 2003). *T. denticola*, other putative periodontal pathogen, also suppresses human lymphocyte proliferative response to mitogens and antigens (Shenker et al., 1984).

The cytokine synthesis profile of the APC plays an important role in establishing the effector function of differentiated Th cells. IL-12 directs Th1 differentiation (Coffman et al., 1999; O'Garra, 1998) while IL-4 mediates Th2 cell differentiation (Swain et al., 1990), and IL-10 skews T cell responses towards T regulatory cells that produce high IL-10 titers and

inhibit Ag-specific T cell responses (Groux et al., 1997). The bacterial preparation increased IL-10 production, suggesting that *P. intermedia* may exert a regulatory effect on T cell response. Further, upregulation of IL-12 has been regarded as a marker of DC maturation (Rescigno et al., 1998). Since *P. intermedia* decreased DC maturation (number of MDDCs positive for CD83), it was expected that the bacterial preparation did not affect or reduce IL-12 production.

Control MDDCs produced low levels of IFN $\gamma$ , and the *P. intermedia* preparation did not affect IFN $\gamma$  production. Impairment of the ability of DCs to undergo further maturation when pulsed with this bacterial preparation, and to produce higher IFN $\gamma$  titers may result in the reduced stimulation of Th1 immunity and the Th2 skewing response seen in periodontitis (Gemmell and Seymour, 1994; Lappin et al., 2001; Seymour, 1987; Yamazaki et al., 1995).

As many as 700 bacterial species colonize the surfaces of the human oral cavity, and 500 species can be detected in subgingival biofilms (Paster et al., 2006). Most species are commensal bacteria that colonize the oral cavity in an overall symbiotic relationship with the host. *P. intermedia*, a component of the indigenous microbiota, is a pathogenic species detected at low levels in the healthy periodontium compared to periodontitis. Thus, the down-regulation of MDDC differentiation, maturation and function reported here is consistent with the notion that to provide sufficient defense against potential pathogens while restricting the immune response to resident bacteria, the mucosal immune system must be tightly regulated. Antigens captured and presented to T cells by DCs under physiological conditions may induce tolerance (Uhlir and Powrie, 2003). In contrast, antigens taken up by DCs in the context of activation stimuli such as those occurring during inflammation or tissue destruction induce prolonged T cell activation. These two functions of DCs maintain tolerance to commensal bacteria.

In conclusion, *P. intermedia* preparation down-regulate MDDC differentiation and maturation and expression of costimulatory molecules, and upregulate IL-10 production inhibiting allogeneic T cell stimulation. These findings suggest that *P. intermedia* may impair adaptive immune responses during the course of periodontitis, or may explain the tolerance to this species under normal physiological conditions.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed by FAPESP (State of São Paulo Research Foundation) (#04/09956-7, 04/14917-04, 06/01396-1 and 05/60193-0) and CNPQ (National Council for Scientific and Technological Development) (304733/2006-7).

The authors thank the Hemocenter of the State University of Campinas for the donation of the buffy coat samples.

## REFERENCES

- Aroonrerk N, Pichyangkul S, Yongvanitchit K, Wisetchang M, Sa-Ard-Iam N, Sirisinha S, Mahanonda R. Generation of gingival T cell lines/clones specific with *Porphyromonas gingivalis* pulsed dendritic cells from periodontitis patients (2003). *J Periodont Res* 38: 262-268.
- Banchereau J, Pulendran B, Steinman R, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells (2000). *Annual Rev Immunol* 18: 767-811.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity (1998). *Nature* 392: 245-252.
- Coffman RL, Mocci S, O'Garra A. The stability and reversibility of Th1 and Th2 populations (1999). *Curr Top Microbiol Immunol* 238: 1-12.
- Emingil G, Karaarslan F, Keskinoglu A, Coker I, Atilla G. Phenotypic and functional analysis of peripheral blood mononuclear cells in generalized aggressive and chronic periodontitis patients (2001). *J Int Acad Periodontol* 3: 87-94.

Gemmell E, Seymour GJ. Modulation of immune responses to periodontal bacteria (1994). *Curr Opin Periodontol* 28-38.

Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response (2002). *Crit Rev Oral Biol Med* 13: 17-34.

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis (1997). *Nature* 389: 737-742.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases (1994). *Periodontol* 2000 5: 78-111.

Huang Q, Liu D, Majewski P, Schulte LC, Korn JM, Young RA et al. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components (2001). *Science* 294: 870-875.

Iwabuchi N, Takahashi N, Xiao JZ, Miyaji K, Iwatsuki K. *in vitro* Th1 cytokine-independent Th2 suppressive effects of bifidobacteria (2007). *Microbiol Immunol* 51: 649-60.

Lanzavecchia A. Dendritic cell maturation and generation of immune responses (1999). *Haematologica* 84: 23-25.

Lappin DF, MacLeod CP, Kerr A, Mitchell T, Kinane DF. Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue (2001). *Clin Exp Immunol* 123: 294-300.

O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets (1998). *Immunity* 8: 275-283.

Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites (2006). *Periodontol* 2000 42: 80-87.

Porcelli SA, Modlin RL. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids (1999). *Annual Rev Immunol* 17: 297-329.

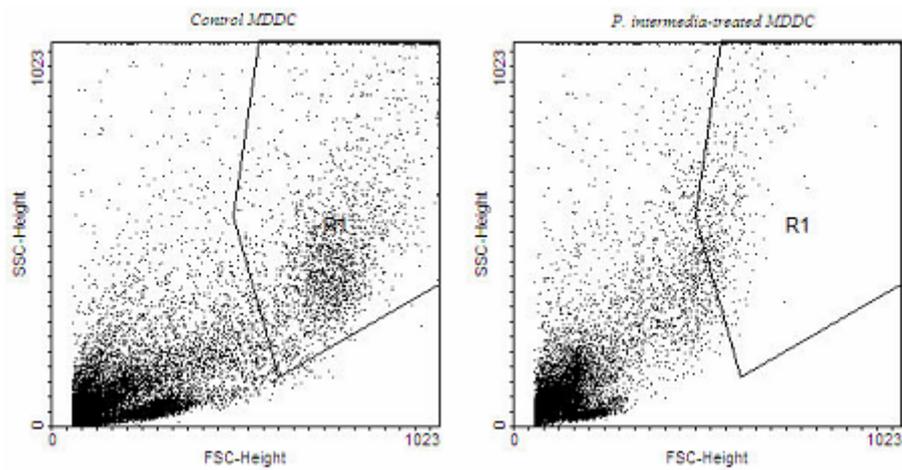
Reis ES, Barbuto JA, Köhl J, Isaac L. Impaired dendritic cell differentiation and maturation in the absence of C3 (2008). *Mol Immunol*: 45:1952-1962.

Rescigno M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. Molecular events of bacterial-induced maturation of dendritic cells (2000). *J Clin Immunol* 20: 161-166.

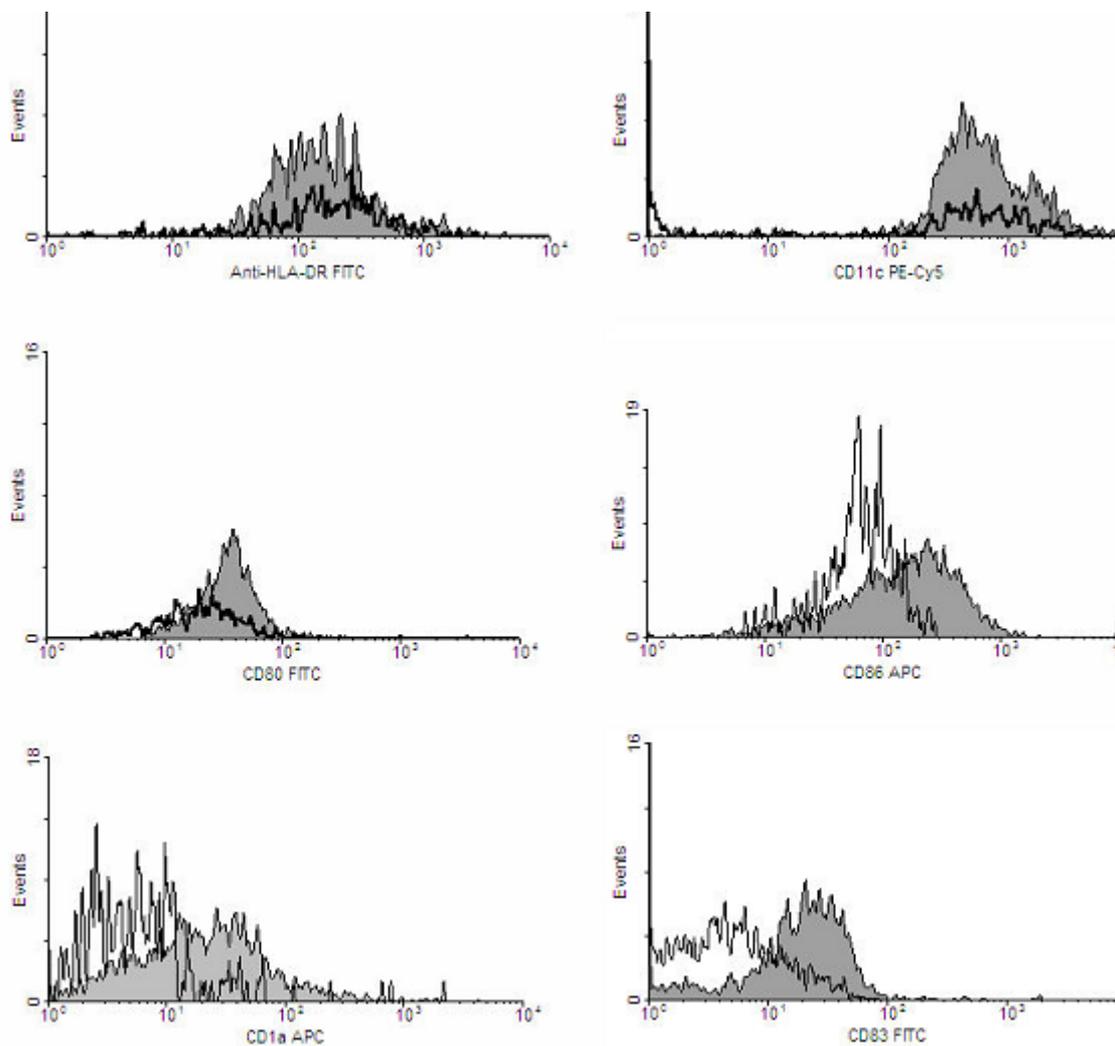
- Rescigno MM, Martino CL, Sutherland MR, Gold, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways (1998). *J Exp Med* 188: 2175.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/ macrophage colony- stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha (1994). *J Exp Med* 179: 1109-1118.
- Schreurs MW, Eggert AA, de Boer AJ, Figdor CG, Adema GJ. Generation and functional characterization of mouse monocyte-derived dendritic cells (1999). *Eur J Immunol* 29: 2835-2841.
- Seymour GJ. Possible Mechanisms Involved in the Immunoregulation of Chronic Inflammatory Periodontal Disease (1987). *J Dent Res* 66: 2-9.
- Shenker BJ, Listgarten MA, Taichman NS. Suppression of human lymphocyte responses by oral spirochetes: a monocyte-dependent phenomenon (1984). *J Immunol* 132: 2039-2045.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque (1998). *J Clin Periodontol* 25: 134-144.
- Stenger S, Niazi KR, Modlin RL. Down-Regulation of CD1 on Antigen-Presenting Cells by Infection with *Mycobacterium tuberculosis* (1998). *J Immunol* 161: 3582-3588.
- Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors (1990). *J Immunol* 145: 3796-3806.
- Thery C, Amigorena S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells (2001). *Curr Opin Immunol* 13: 45-51.
- Uhlig HH, Powrie F. Dendritic cells and the intestinal bacterial flora: a role for localized mucosal immune responses (2003). *J Clin Invest* 112: 648-651.
- Urban BC, Ferguson DJ, Pain A, Willcox N, Plebanski M, Austyn JM et al. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells (1999). *Nature* 400: 73-77.
- Van Overtvelt L, Vanderheyde N, Verhasselt V. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules (1999). *Infect Immun* 67: 4033-4040.

Yamazaki K, Nakajima T, Hara K. Immunohistological analysis of T cell functional subsets in chronic inflammatory periodontal disease (1995). Clin Exp Immunol 99: 384-391.

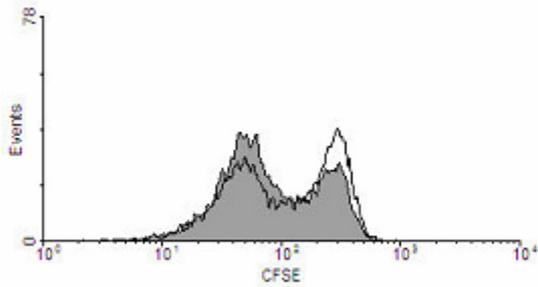
**Figure 1. MDDC yield and morphology.** *Prevotella intermedia* preparation induced a 2.7-fold reduction in the percentage of cells of larger cell-size (FSC) and greater granularity (SSC).



**Figure 2.** Expression of HLA-DR, CD11c, CD80, CD86, CD83 and CD1a by MDDCs. *P. intermedia* preparation affected MDDC differentiation and maturation, downregulating HLA-DR, CD11c, CD1a, CD80, CD86 and CD83. *Filled histograms* represent unstimulated cells; *empty histograms* represent *P. intermedia*-stimulated cells.



**Figure 3. T cell proliferation.** *Prevotella intermedia*-pulsed MDDCs inhibited the proliferation of allogeneic T cells 0.66 ( $\pm 0.16$ )-fold (*Empty histogram*) compared to control MDDCs (*Filled histogram*).



**Fig. 4. IFN $\gamma$ , IL-10 and IL-12 titers expressed in untreated and *Prevotella intermedia*-treated MDDCs.** Untreated MDDCs produced high IL-10 titers, and lower or non-detectable IFN $\gamma$  and IL-12 titers, respectively. The bacterial preparation down-regulated IFN $\gamma$  production but upregulated IL-10 and IL-12 production (N= 4). \* $p < 0.05$  compared to untreated MDDCs

