



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FERNANDA AKEMI NAKANISHI

**Obtenção e utilização de anticorpos policlonais  
para análise de protease de *Aggregatibacter  
actinomycetemcomitans* à imunoglobulina G  
em periodontites e infecção experimental em  
camundongos**

---

Londrina  
2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FERNANDA AKEMI NAKANISHI

**Obtenção e utilização de anticorpos policlonais  
para análise de protease de *Aggregatibacter  
actinomycetemcomitans* à imunoglobulina G  
em periodontites e infecção experimental em  
camundongos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Microbiologia, da  
Universidade Estadual de Londrina, como  
requisito para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eiko Nakagawa Itano

Londrina

2008

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada do Departamento de Ciências Patológicas, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina e contou com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, FINEP, Fundação Araucária, FAEP/UEL, SETI/PR (28/2006).

FERNANDA AKEMI NAKANISHI

**Obtenção e utilização de anticorpos policlonais  
para análise de protease de *Aggregatibacter  
actinomycetemcomitans* à imunoglobulina G  
em periodontites e infecção experimental em  
camundongos**

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Yoko Hirooka

Universidade Estadual de Londrina

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jacinta Sanchez Pelayo

Universidade Estadual de Londrina

---

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup> Maria Angélica Ehara Watanabe

Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Emerson José Venâncio

Universidade Estadual de Londrina

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eiko Nakagawa Itano

Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 31 de março de 2008.

A Deus e à Nossa Senhora por  
estarem sempre presentes na minha  
vida, me protegendo, me abençoando  
e tornando tudo possível.

Aos meus pais, Luiz e Kazumi, aos meus irmãos Luiz Rodrigo e Isabela, ao meu namorado Daniel, aos meus avós, tios, primos, aos meus sogros e cunhados pela compreensão nos meus dias de ausência, pelo carinho e apoio incondicional que sempre me ofereceram. Quero expressar meu amor infinito por vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eiko Nakagawa Itano pela competência em ensinar, pela paciência em orientar e pelas oportunidades oferecidas. Que além de professora e orientadora se mostrou uma grande amiga, com quem eu pude contar em diversos momentos e situações difíceis. Um Mestre que devemos seguir os passos. Minha eterna gratidão!

À Coordenação e aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, pelos sacrifícios constantes, pelo incentivo e pela brilhante maneira de ensinar Microbiologia.

Aos Prof<sup>os</sup>. Elisa Yoko Hirooka, Emerson José Venâncio, Jacinta Sanchez Pelayo, Márcia Cristina Furlaneto, Maria Angélica Ehara Watanabe, Mirian Marubayashi Hidalgo, pelos ensinamentos e pela grande colaboração prestada nesse trabalho.

Ao Prof<sup>o</sup>. Ms. João Gilberto Prata Carnio pela colaboração no fornecimento de amostras salivares.

Aos amigos Mári Sumigawa Kaminami e Nilson de Jesus Carlos, pela amizade, pelos ensinamentos, pela dedicação e pelo apoio que sempre me prestaram nos experimentos. Muito obrigada por tudo!



Aos meus colegas de laboratório Alexandre Sasaki, Andréa Fredrich, Audrey de Souza Marquez, Berenice Tomoko Tatibana, Carla Cristine Crude dos Santos, Cauê Zortéa Fernandes da Costa, Cristina Megumi Taniyama, Franciele Ayumi Semencio Chiyoda, Juliana Gerez, Leniza Ludwig, Maria Cláudia Noronha Dutra de Menezes, Rosália Hernandes Fernandes Vivan, Solange de Paula Ramos, Tânia Maris Pedrini Soares da Costa, Thiago Yuiti Castilho Massuda, Welder Franzini Amaral Callera, Wilson Candido Junior, pela amizade, ajuda e momentos agradáveis.

A Kátia Key Oshiro, Luciene Airy Nagashima, Nádia Hizuru Kamiji, Paula Cesar Leonello e Thiago Cezar Fujita o meu muito obrigada. Pessoas que me ensinaram a ter espírito de equipe. Cada um com o seu jeito de ser deixou uma importante marca nesta fase de minha vida. Já estou sentindo falta de vocês no meu dia a dia.

A todos os meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, em especial á Eliana Carolina Vespero e Newton Hashimoto, pela amizade, ajuda e pelo apoio em todos os momentos do Mestrado e Doutorado.

À D. Elvina e Sr. Cornélio de Freitas, pela amizade, pela torcida e pelo apoio nos momentos difíceis.

Aos funcionários do Centro de Ciências Biológicas pela gentileza que sempre me atenderam.

Aos pacientes, pela colaboração imprescindível na realização desse trabalho.

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

NAKANISHI, Fernanda Akemi. **Obtenção e utilização de anticorpos policlonais para análise de protease de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* à imunoglobulina G em periodontites e infecção experimental em camundongos.** 2008. Tese (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina

### RESUMO

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* está freqüentemente associado a vários quadros de periodontites e infecções não orais. Há controvérsias quanto aos dados de nível de imunoglobulinas específicas em pacientes com periodontites, o que pode ser decorrente da ação de protease de *A. actinomycetemcomitans*. O objetivo do trabalho foi obter e utilizar os anticorpos policlonais para a análise de protease à IgG humana em isolados de *A. actinomycetemcomitans*, avaliar nível de IgG específica, analisar efeito de sobrenadante de cultivo de *A. actinomycetemcomitans* no nível de IgG específica em salivas de pacientes com periodontites, avaliar nível de protease à imunoglobulina G no decorrer da infecção experimental em camundongos. Foram obtidos inicialmente anticorpos policlonais de coelho e de camundongos por imunização dos mesmos com a fração cromatográfica de sobrenadante de cultura de Aa ATCC 43718 com atividade de protease. Os anticorpos obtidos foram analisados por *western blotting* (WB) e por cromatografia em coluna de *sephadex* G-150. Esses anticorpos policlonais foram utilizados para determinar níveis de protease em amostras de sobrenadante de cultivo de isolados provenientes de pacientes com periodontite agressiva localizada (PAL) e com periodontite ulcerativa necrotizante associada à síndrome da imunodeficiência adquirida (PUN/SIDA), por ELISA captura. Adicionalmente foi realizada a análise de nível de IgG anti-protease em amostras de salivas de pacientes com PAL e controles saudáveis e o efeito de sobrenadante de cultura de cepa de referência (ATCC 43718) no nível de IgG anti-leucotoxina em salivas de pacientes com PAL utilizando ELISA indireto. Utilizando a mesma metodologia foi realizada a análise de nível de protease em tecidos e plasma além de anticorpo específico em camundongos BALB/c infectados por inoculação bucal de *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 43718 sorotipo b) nos

dias 15, 30 e 60 pós-infecção. Os resultados obtidos demonstraram que os anticorpos interagem com antígeno de ~50kDa por WB, sendo capazes reconhecerem as frações cromatográficas contendo atividade de protease. Por ELISA captura, foi observado nível similar de protease nos isolados com PAL e PUN/SIDA. Por ELISA indireto foi observado nível significativamente mais elevado de IgG anti-protease em grupo de salivas de pacientes com PAL em relação ao grupo saudável e após a incubação de salivas com sobrenadante de cultura houve decréscimo no nível de IgG específica em todas as amostras analisadas. Em camundongos infectados foram observados níveis significativamente elevados de protease em tecidos e no plasma, sendo em nível maior na fase inicial da infecção para amostras de gengiva palatal enquanto que os níveis cardíaco e cerebral foram maiores na fase mais tardia (60 dias). Foi observado também aumento significativo no nível plasmático de IgG anti-protease em nível mais elevado no período de 15/30 que 60 dias pós-infecção. Concluimos pelos resultados obtidos que a protease presente no sobrenadante de cultura de *A. actinomycetemcomitans* possivelmente apresenta MM de ~50 kDa, que os níveis de protease à IgG são similares entre os isolados provenientes de pacientes com PAL e PUN/SIDA, que ocorre aumento no nível salivar de IgG específica e que os níveis de anticorpos específicos podem sofrer decréscimo pela atuação de sobrenadante de cultivo de *A. actinomycetemcomitans*, sugerindo potencial desse microrganismo em alterar título de anticorpos na saliva. Concluimos também que a infecção bucal de camundongos com *A. actinomycetemcomitans* induz aumento no nível de protease à IgG, tanto localmente como de forma sistêmica e, se esse aumento interfere na diminuição de IgG específica à *A. actinomycetemcomitans* no decorrer da infecção, requer estudos adicionais.

**PALAVRAS-CHAVES:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, protease, imunoglobulina G, periodontites, camundongos, saliva

NAKANISHI, Fernanda Akemi. **Production and using polyclonal antibodies for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* protease to imunoglobulina G in periodontitis and experimental infection in mice.** 2008. Thesis (Program of Postgraduation in Microbiology) – State University of Londrina.

### ABSTRACT

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is frequently associated to periodontitis and extra oral infections. The immunoglobulins specific's level controversies in the literature could be due to the protease released by this microorganism with capacity of degrading immunoglobulin G. The objective of present work was to produce policlonals antibodies to *A. actinomycetemcomitans* protease and to use these antibodies for the protease dosage in *A. actinomycetemcomitans* clinical isolates, for evaluate the salivary specific IgG levels and for the effect of culture supernatants in salivary specific IgG level from periodontitis patients and also for evaluate the protease levels and specific IgG levels in the course of the experimental infection in mice. Initially, rabbit and mice policlonal antibodies were obtained by using protease fraction (Aa ATCC 43718 sephadex G-150 chromatography fractions) and analyzed by western blotting (WB) and by chromatography fractions interactions. By using these antibodies, the levels of protease were determined in *A. actinomycetemcomitans* culture supernatants (*A. actinomycetemcomitans* isolated from localized aggressive periodontitis (LAP), with necrotizing ulcerative periodontitis associated to acquired immunodeficiency syndrome NUP/AIDS) and reference Aa ATCC 43718), by ELISA capture. Additionally salivary IgG anti-protease level and the effect of Aa ATCC 43718 culture supernatant in the level of IgG anti-leucotoxin were determined by indirect ELISA. Also the protease levels in palatal, cardiac and cerebral tissues and plasma from BALB/c mice infected with oral inoculation of *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 43718 serotype b) were analyzed by ELISA capture, at 15, 30 and 60 days post-infection (p.i). Additionally IgG anti-protease to IgG level was determined by indirect ELISA. The results showed the antibodies interaction with ~50kDa antigen by WB,

and also recognition of protease active chromatography fractions. By ELISA capture, it was observed protease levels are similar between clinical isolated of LAP and PUN/AIDS group. Also higher IgG anti-protease level was detected in the PAL salivary samples in relation to healthy group by indirect ELISA. According to expected after the incubation of saliva with culture supernatants it was observed decreased specific IgG level. In conclusion, the *A. actinomycetemcomitans* protease to IgG possibly presents MM of ~50 kDa, it was observed protease levels are similar between clinical isolated of LAP and PUN/AIDS group. Also the salivary IgG anti-protease is increased in PAL patients and the specific salivary antibodies levels can be decreased by soluble proteases presents in *A. actinomycetemcomitans* culture supernatants, suggesting potential of this microorganism in altering title of antibodies in the saliva. In infected mouse it was observed significantly increased levels of protease to IgG in plasma and infected tissues, with higher levels in the initial phase of the infection (15 days) in the palatal and later phase in cardiac and cerebral tissues. Also significantly IgG anti-protease increased levels was observed in plasma of infected group, more evident in 15/30 than 60 days p.i. In conclusion, the *A. actinomycetemcomitans* protease to IgG possibly presents MM of ~50 kDa, the protease levels are similar between clinical isolated of LAP and PUN/AIDS group, the salivary IgG anti-protease is increased in PAL patients and the specific salivary antibodies levels can be decreased by *A. actinomycetemcomitans* culture supernatants, suggesting potential of this microorganism in altering title of antibodies in the saliva. Also the oral *A. actinomycetemcomitans* mice infection induces local as systemic increase in the protease level and, if this increased level interferes in the reduction of specific IgG to *A. actinomycetemcomitans* in the course of the infection, require additional studies.

**KEYWORDS:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, protease, immunoglobulin G, periodontitis, mice, saliva

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	22
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	23
2.1. Aspectos gerais de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> .....	23
2.2. <i>A. actinomycetemcomitans</i> e periodontites .....	25
2.3. Tratamento de periodontites .....	27
2.4. Fatores de virulência de <i>A. actinomycetemcomitans</i> .....	29
2.5. Considerações gerais sobre imunoglobulinas .....	32
2.6. Doença periodontal: modelo experimental em animais .....	33
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	35
4. OBJETIVOS .....	51
4.1. Objetivo geral .....	51
4.2. Objetivos específicos .....	51
5. Artigo 1 .....	53
<b>Produção de anticorpos policlonais para análise de protease à IgG em isolados clínicos de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> e de nível salivar de IgG específica</b>	
5.1. Resumo .....	54
5.2. Abstract .....	56
5.3. Introdução .....	57
5.4. Material e Métodos .....	59
5.4.1. Pacientes e indivíduos saudáveis .....	59
5.4.2. Obtenção de amostras salivares .....	59
5.4.3. Microrganismo.....	59
5.4.4. Obtenção de sobrenadante de cultura.....	60
5.4.5. Cromatografia em coluna <i>Sephadex G-150</i> .....	60
5.4.6. Obtenção de anticorpos policlonais anti-protease de <i>A.actinomycetemcomitans</i> à IgG em coelho e em camundongo .....	60

5.4.7. Análise de anticorpos de coelho anti-protease e análise de protease das frações de cromatografia ( <i>Sephadex G-150</i> ).....	61
5.4.8. Análise de anticorpos policlonais por <i>Western blotting</i> . ....	61
5.4.9. ELISA captura para detecção de protease nos sobrenadantes de diferentes isolados de <i>A. actinomycetemcomitans</i> e na cepa de referência ATCC 43718 .....	62
5.4.10. Análise de IgG salivar anti-protease de <i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43718 à IgG por ELISA .....	62
5.4.11. Obtenção de fração de leucotoxina .....	63
5.4.12. Análise de IgG salivar anti-leucotoxina pré-tratada com sobrenadante de <i>A.actinomycetemcomitans</i> ATCC 43718 por ELISA .....	63
5.4.13. Análise estatística .....	64
5.5. Resultados .....	65
5.5.1. Análise de reatividade de anticorpos anti-protease e de atividade da protease, utilizando frações de cromatografia, por ELISA.....	65
5.5.2. Análise de anticorpos policlonais obtidos por <i>Western blotting</i> .....	65
5.5.3. ELISA captura para detecção de protease nos sobrenadantes de diferentes isolados de <i>A. actinomycetemcomitans</i> e na cepa de referência ATCC 43718 .....	65
5.5.4. Análise de IgG salivar anti-protease de <i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43718 à IgG de pacientes com PAL por ELISA .....	66
5.5.5. Análise de IgG salivar anti-leucotoxina pré-tratada com sobrenadante de <i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43718 por ELISA .....	66
5.6. Discussão .....	67
5.7. Referências bibliográficas .....	70
6. Artigo 2.....	81
<b>Nível local e sistêmico de protease de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> à imunoglobulina G no decorrer da infecção bucal em camundongos Balb/c</b>	
6.1. Resumo .....	82



<b>6.2. Abstract</b> .....	<b>83</b>
<b>6.3. Introdução</b> .....	<b>84</b>
<b>6.4. Material e Métodos</b> .....	<b>86</b>
<b>6.4.1. Animais</b> .....	<b>86</b>
<b>6.4.2. Microrganismo</b> .....	<b>86</b>
<b>6.4.3. Protocolo experimental</b> .....	<b>86</b>
<b>6.4.4. Obtenção de fração de protease à IgG por cromatografia em coluna Sephadex G-150</b> .....	<b>87</b>
<b>6.4.5. Obtenção dos anticorpos policlonais anti-protease de <i>A.actinomycescomitans</i> à IgG em coelho e em camundongo</b> .....	<b>87</b>
<b>6.4.6. ELISA captura para detecção de antígeno em amostras de tecido</b> .....	<b>88</b>
<b>6.4.7. ELISA captura para detecção de antígeno solúvel no plasma</b> .....	<b>88</b>
<b>6.4.8. Análise de IgG anti-protease de <i>A.actinomycescomitans</i> à IgG no plasma por ELISA</b> .....	<b>89</b>
<b>6.4.9. Análise estatística</b> .....	<b>89</b>
<b>6.5. Resultados</b> .....	<b>90</b>
<b>6.5.1. Nível de protease de <i>A. actinomycescomitans</i> à IgG em amostra de gengiva palatal</b> .....	<b>90</b>
<b>6.5.2. Nível de protease de <i>A. actinomycescomitans</i> à IgG em amostra de tecido cardíaco</b> .....	<b>90</b>
<b>6.5.3. Nível de protease de <i>A. actinomycescomitans</i> ATCC 43718 à IgG em amostras de cérebro</b> .....	<b>90</b>
<b>6.5.4. Nível de protease de <i>A. actinomycescomitans</i> à IgG no plasma</b> .....	<b>90</b>
<b>6.5.5. Nível de IgG anti-protease de <i>A. actinomycescomitans</i> à IgG no plasma</b> .....	<b>91</b>
<b>6.6. Discussão</b> .....	<b>92</b>
<b>6.7. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>94</b>
<b>7. Conclusões</b> .....	<b>103</b>
<b>8. Anexo</b> .....	<b>105</b>

## LISTAS DE FIGURAS

**ARTIGO 1:** Produção de anticorpos policlonais para análise de protease à IgG em isolados clínicos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e de nível salivar de IgG específica

**Figura 1:** Perfil espectrofotométrico de sobrenadante de cultivo de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 ..... 75

**Figura 2:** Resultado da análise por *Western blotting*..... 76

**Figura 3:** Nível de protease à IgG de sobrenadantes de cultura de isolados de *A. actinomycetemcomitans* e da cepa de referência ATCC 43718 por ELISA captura ..... 77

**Figura 4:** Nível de IgG anti-protease de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 á IgG em grupo de amostras de salivas de pacientes com PAL e grupo controle. .... 78

**Figura 5:** Nível de IgG anti-protease de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 á IgG em amostras de salivas de pacientes com PAL. .... 79

**Tabela 1:** Nível de IgG salivar anti-leucotoxina de pacientes com PAL tratados e não tratados com sobrenadante de cultura de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 detectados por ELISA ..... 80

**ARTIGO 2:** Nível local e sistêmico de protease de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* à imunoglobulina G no decorrer da infecção bucal em camundongo.

**Figura 1:** Nível de protease de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 à IgG em amostras de gengiva palatal..... 98

**Figura 2:** Nível de protease de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 à IgG em amostras de coração ..... 99

**Figura 3:** Nível de protease de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 à IgG em amostras de cérebro..... 100

**Figura 4:** Nível de protease de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 à IgG no plasma ..... 101

**Figura 5:** Nível de IgG anti-protease de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 à IgG nos plasmas ..... 102

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Aa	.....	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Ag-Ac	.....	Antígeno-Anticorpo
AIDS	.....	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ATCC	.....	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	.....	<i>Brain Heart Infusion</i>
Cdt	.....	<i>Cytolethal distending toxin</i>
cm	.....	Centímetros
CO <sub>2</sub>	.....	Gás Carbônico
DAB	.....	Diaminobenzidina
D.O.	.....	Densidade Óptica
DP	.....	Doença Periodontal
ELISA	.....	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
g	.....	Gramas
HIV	.....	Vírus da Imunodeficiência Humana
Ig	.....	Imunoglobulina
IgA	.....	Imunoglobulina A
IgG	.....	Imunoglobulina G
IgM	.....	Imunoglobulina M

IL	.....	Interleucina
INF	.....	<i>Interferon</i>
kDa	.....	Quilodalton
LAP	.....	<i>Localized Aggressive Periodontitis</i>
LPS	.....	Lipopolissacarídeo
M	.....	Molar
M-CSF	.....	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
mg	.....	Miligramas
MG	.....	Minas Gerais
ml	.....	Mililitros
N	.....	Normal
nm	.....	Nanômetros
nº.	.....	Número
NUP	.....	<i>Necrotizing Ulcerative Periodontitis</i>
OPD	.....	Orto-Feniletildenodiamino Diidroclorato
PA	.....	Periodontite Agressiva
PAL	.....	Periodontite Agressiva Localizada
PBS	.....	Tampão Salina Fosfato
PC	.....	Periodontite Crônica
PJL	.....	Periodontite Juvenil Localizada
p.i	.....	<i>Post-Infection</i>
PUN	.....	Periodontite Ulcerativa Necrotizante
SDS-PAGE		Eletroforese em gel de poliacrilamida com Sódio Dodecil Sulfato
SIDA	.....	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

Th1	.....	<i>T Helper 1</i>
Th2	.....	<i>T Helper 2</i>
TNF	.....	Fator de Necrose Tumoral
TSBV	.....	Soja Trypticaseína Bacitracina-Vancomicina
UV	.....	Ultra-Violeta
WB	.....	<i>Western Blotting</i>
$\alpha$	.....	Alfa
~	.....	Aproximadamente
$\beta$	.....	Beta
$\gamma$	.....	Gama
°C	.....	Graus Celsius
>	.....	Maior
±	.....	Mais ou Menos
<	.....	Menor
$\mu\text{g}$	.....	Microgramas
$\mu\text{l}$	.....	Microlitros
$\mu\text{m}$	.....	Micrômetros
%	.....	Porcento
2°	.....	Segundo
2nd	.....	Second
3°	.....	Terceiro

## 1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal engloba um número de entidades clínicas distintas que afeta o periodonto, incluindo gengiva, ligamento periodontal, cemento e osso alveolar de suporte. A periodontite juvenil localizada (PJL), atualmente denominada periodontite agressiva localizada (PAL) (ARMITAGE, 1999) é uma forma de periodontite que progride rapidamente e envolve uma perda óssea extensa ao redor dos incisivos e primeiros molares permanentes (BAER, 1971) e está freqüentemente associado à *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* (NØRSLOV-LAURITSEN & KILIAN, 2006). Esse microrganismo está presente também em pacientes com doença periodontal associada à síndrome da imunodeficiência adquirida (DP/SIDA) (MURRAY *et al.*, 1989; ZAMBON *et al.*, 1990; RAMS *et al.*, 1991).

*A. actinomycetemcomitans* é um cocobacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, não móvel e formador de catalase (ZAMBON, 1985). Pode causar várias infecções não orais, pois já foi isolado de abscessos cerebrais, abdominais, faciais, endocardites, infecção urinária (GARNER, 1979) e pulmonar necrosante (MORRIS & SEWELL, 1994). Vários estudos têm demonstrado a associação de *A. actinomycetemcomitans* com doenças cardiovasculares (HARASZTHY *et al.*, 2000; SAKURAI *et al.*, 2007).

Esse microrganismo produz diversos fatores de virulência, sendo que a protease com ação sobre imunoglobulina G (IgG) (GREGORY *et al.*, 1992; NAKANISHI *et al.*, 2006) é um dos mais importantes fatores de virulência dessa bactéria. A atividade proteolítica de *A. actinomycetemcomitans* pode ter um papel importante envolvido na desregulação da resposta imune do hospedeiro.

Modelos experimentais em animais têm sido utilizados para se estudar a doença periodontal (TENG, 2002; GARLET *et al.*, 2005; KURLAND *et al.*, 2006; ROGERS *et al.*, 2007). Embora esses modelos possuam limitações, eles são muitas vezes superiores aos estudos *in vitro* e clínicos e servem como uma conexão essencial entre hipóteses e pacientes humanos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Aspectos gerais de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

O microrganismo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* é um cocobacilo Gram-negativo, possuindo aproximadamente  $0,4 \pm 0,1 \times 1,0 \pm 0,4$   $\mu\text{m}$  de tamanho, não móvel e formador de catalase. As características morfológicas e de cultivo de *A. actinomycetemcomitans* foram descritas pela primeira vez por Klinger em 1912. Foi extraído de actinomicose cérvico-facial humana e denominado de *Bacterium actinomycetum comitans*. Este nome foi alterado três vezes, primeiro por Lieske em 1921 para *Bacterium comitans* e em 1929 passou a chamar *Actinobacillus actinomycetemcomitans* por Topley & Wilson (ZAMBON, 1985). O termo “*Actinobacillus*” se refere à estrutura interna em forma de estrela que se aderem firmemente à superfície do meio sólido (SLOTS *et al.*, 1980). A reclassificação que resultou na denominação atual (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) ocorreu recentemente por Nørslov-Lauritsen & Kilian (2006).

*A. actinomycetemcomitans* é capnofílico, requerendo uma atmosfera contendo 5-10% de  $\text{CO}_2$  para um bom crescimento (SLOTS, 1982). Esse microrganismo é microaerófilo e anaeróbio facultativo, podendo crescer em baixas condições anaeróbicas (PULVERER & KO, 1970).

Screenivasan *et al.* (1993) estudando fatores que influenciam o crescimento e a viabilidade de *A. actinomycetemcomitans* relataram que o crescimento é estimulado por L-cistina, tiamina e por vários hormônios esteróides incluindo estrógeno, progesterona e testosterona, ocorrendo também crescimento ótimo a uma temperatura de  $37^\circ\text{C}$ .

Esta bactéria pode ser separada em dez biotipos, conforme a utilização dos carboidratos dextrina, galactose, maltose, manitol e xilose (SLOTS *et al.*, 1980), e em seis sorotipos: a, b, c, d, e, f (GMÜR *et al.*, 1993; KAPLAN *et al.*, 2001) baseados nos antígenos de superfície celular (ZAMBON *et al.*, 1983b). Os antígenos determinantes do sorotipo são



polissacarídeos de superfície termo-estáveis que parecem ser exclusivos de *A. actinomycetemcomitans* (SLOTS, 1994).

O primeiro estágio de qualquer processo infeccioso envolve a adesão do microrganismo no tecido do hospedeiro tanto diretamente ou através de algum microrganismo intermediário. No caso de *A. actinomycetemcomitans* envolve adesão a qualquer das variadas superfícies epiteliais, à superfície dentária ou a bactérias que já estão colonizando essas superfícies (MEYER & FIVES-TAYLOR, 1993).

A presença de carboidratos na superfície dessa sob a forma de microcápsula (HOLT *et al.*, 1980; CALIFANO *et al.*, 1992) facilita sua colonização na bolsa periodontal (ZAMBON *et al.*, 1983b). Também, Meyer & Fives-Taylor (1994) propuseram que as fímbrias são responsáveis pela aderência nas variantes rugosas, enquanto componentes não fimbriais (microvesículas ou material amorfo extracelular) estariam envolvidos na aderência das formas lisas (CHRISTERSSON *et al.*, 1987) de cepas altamente invasivas, que são encontradas no interior dos tecidos de pacientes com periodontite agressiva avançada (SAGLIE *et al.*, 1991).

O sorotipo b parece ser o tipo predominante em humanos, embora outros sorotipos tenham sido identificados individualmente e em famílias (ZAMBON *et al.*, 1983a; McARTHUR *et al.*, 1986; EBERSOLE *et al.*, 1991; ASIKAINEN *et al.*, 1991b), como sorotipo c presente entre os pacientes do Japão (Tiha *et al.*, 2007).

O microrganismo *A. actinomycetemcomitans* está freqüentemente associado a vários quadros de periodontites (CHRISTERSSON *et al.*, 1987; van-STEENBERGEN *et al.*, 1994), podendo também fazer parte da microbiota bucal (KILLIAN & SCHIOTT, 1975; LISTGARTEN *et al.*, 1981) uma vez que foi encontrada em mais de 36% de indivíduos saudáveis, embora em pequenas quantidades (ASIKAINEN *et al.*, 1991a). Pode também causar infecções severas pelo corpo, pois já foi isolado de abscessos cerebrais, abdominais, faciais, endocardites, infecção urinária (GARNER, 1979) e pulmonar necrosante (MORRIS & SEWELL, 1994). Estudos de Sakurai *et al.* (2007) apontam que patógenos periodontais, principalmente *A. actinomycetemcomitans*, pode exercer papel no desenvolvimento de síndrome coronária aguda.

Quando cultivados em meio, isolados clínicos de *A. actinomycetemcomitans* formam biofilmes nas superfícies tais como vidros, plásticos e hidroxiapatita da saliva (FINE *et al.*, 1999a; FINE *et al.*, 1999b; KAPLAN *et al.*, 2003).

Kaplan & Fine (2002) mostraram que as cepas de *A. actinomycetemcomitans* organizados em biofilmes são capazes de liberar células solitárias ou pequenos aglomerados de células dentro do meio líquido. Estas células liberadas podem aderir à superfície do recipiente de cultura e formar novos agrupamentos, capacitando o biofilme de se espalhar.

Uma vez ocorrida a colonização, existem evidências de que *A. actinomycetemcomitans* pode invadir os tecidos periodontais. A habilidade deste microrganismo para invadir os tecidos periodontais pode explicar em parte as dificuldades encontradas na sua erradicação dos sítios da doença apenas por meios mecânicos que é o tratamento principal da terapia convencional das doenças periodontais (MOMBELLI *et al.*, 1994).

Alguns estudos sugerem que *A. actinomycetemcomitans* pode ser transmitido entre membros da família. Alauusua *et al.* (1991) sugerem também a transmissão baseada na prevalência e na distribuição de sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* dentro de famílias. Todavia não parece ser transmitido facilmente e múltiplos contatos são provavelmente necessários para que ocorra a colonização bucal. Relatos de casos individuais bem como estudos de distribuição de *A. actinomycetemcomitans* indicam que a doença pode ser considerada transmissível (ZAMBON *et al.*, 1983a; PREUS & OLSEN, 1988; DOGAN *et al.*, 2008).

## **2.2. *A. actinomycetemcomitans* e periodontites**

A doença periodontal engloba um número de entidades clínicas distintas que afeta o periodonto, incluindo gengiva, gengiva inserida, ligamento periodontal, cemento e osso alveolar de suporte (NISENGARD *et al.*, 1994). Doenças periodontais têm sido consideradas por alguns pesquisadores como sendo uma reação imune à bactéria ou a seus produtos que fica fora de controle e prejudica o tecido do hospedeiro (PALENSTEIN-HELDERMAN, 1981).

Um comitê de pesquisadores e dentistas formado pela Academia Americana de Periodontia, em 1997, chegou a um acordo sobre a nova classificação das doenças periodontais no “Workshop Internacional para a Classificação de Condições e Doenças Periodontais”, realizado em 1999.

As periodontites passaram a serem classificadas em: periodontite crônica (PC); periodontite agressiva (PA); periodontite como uma manifestação de doença sistêmica; periodontite associada a lesões endodônticas e periodontite modificadas por fatores sistêmicos (ARMITAGE *et al.*, 1999).

Os participantes do Workshop concordaram com o termo PA desde que fosse menos restrito quanto à idade e à designação de periodontite de incidência precoce. O grupo sugeriu que qualquer sistema de classificação das diferentes formas de periodontites não deveria basear-se na idade do paciente, mas no histórico, nos achados laboratoriais, clínicos e radiográficos (LANG *et al.*, 1999).

A nova designação PAL substituiu o antigo termo periodontite juvenil localizada. Similarmente, a antiga classificação periodontite juvenil generalizada deu lugar a nova nomenclatura periodontite agressiva generalizada. A PA apresenta achados laboratoriais e clínicos claramente identificados e que podem ser suficientemente diferenciados da PC (antiga periodontite do adulto), assegurando a classificação separada (LANG *et al.*, 1999).

O microrganismo *A. actinomycetemcomitans* está frequentemente associado a vários quadros de periodontites (CHRISTERSSON *et al.*, 1987; van- STEENBERGEN *et al.*, 1994). Na PAL, este microrganismo aparece como agente predominante (PAGE *et al.*, 1985; ZAMBON, 1985; ASIKAINEN *et al.*, 1987). Já na PC, está associado a outros microrganismos, como *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* (SLOTS & LISTGARTEN, 1988; SLOTS, 1994). Está presente também em pacientes com doença periodontal associada à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS/DP) (MURRAY *et al.*, 1989; ZAMBON *et al.*, 1990; RAMS *et al.*, 1991).

Doença periodontal é frequentemente observada em pacientes com deficiências na sua capacidade de defesa, tais como pacientes HIV-positivos. Várias lesões destrutivas, sangramentos gengivais espontâneos e necrose

tecidual podem ser observados nesses pacientes associados à periodontite ulcerativa necrosante (AIDS/PUN) (CORONADO *et al.*, 1996).

A PAL é uma forma de periodontite que progride rapidamente e envolve uma extensa perda óssea ao redor dos incisivos e primeiros molares permanentes (BAER, 1971). A base dessa distribuição tem sido sugerida como resultado da natureza temporal destes dentes, por emergirem mais cedo na cavidade oral (GRANT *et al.*, 1988). Geralmente, nesse quadro clínico, observa-se a presença de uma quantidade mínima de placa dental e cálculo (BAER, 1971; BUTLER, 1969; CATON, 1989), pois o bacilo *A. actinomycetemcomitans* produz um fator solúvel que inibe o crescimento e a proliferação de *Actinomyces viscosus* e *Streptococcus sanguis*, microrganismos intimamente associados à formação de placa (BAEHNI *et al.*, 1981). A quantidade de depósitos microbianos é inconsistente com a severidade da destruição dos tecidos periodontais e a progressão da perda óssea e de inserção (THE AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2000).

Existe também uma relação inversa entre cáries e PAL (FINE *et al.*, 1984), já que a presença desse bacilo na microbiota oral tem mostrado ser incompatível com *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus mitis* (HILLMAN & SOCRANSKY, 1982). Estudos de Fine *et al.* (2007) demonstraram que indivíduos que possuem *A. actinomycetemcomitans* têm um fator salivar que reduz significativamente a sobrevivência de *Streptococcus mutans*, que pode ajudar a explicar o fato desse grupo possuir tipicamente pouca quantidade de cáries.

A prevalência da PAL é considerada mais alta em países do 3º Mundo (0,3-8%) do que em países industrializados (0,1%). Estudo de Tinoco *et al.* (1997) demonstraram que *A. actinomycetemcomitans* está altamente relacionada a PAL na população brasileira.

Por sua vez, a PC, caracteriza-se por uma inflamação crônica dos tecidos periodontais, podendo atingir diversos estágios. É um dos tipos mais freqüentes de periodontites. Pode ocorrer em qualquer idade, mas é mais comumente detectada em adultos (LINDHE *et al.*, 1999). A quantidade de destruição tecidual observada na periodontite crônica é consistente com a

presença de fatores locais como presença de diferentes espécies bacterianas e cálculo subgingival (QUERIDO *et al.*, 2006).

Pesquisas de Yapar *et al.* (2003) sugerem que herpesvírus periodontal abrange uma fonte importante para iniciar um processo de destruição do tecido periodontal. Em particular, citomegalovírus humano e vírus *Epstein-Barr* ocorrem freqüentemente em locais de PA. O tropismo tecidual de infecções herpesvírus pode ajudar a explicar o modelo localizado de destruição tecidual em periodontites. A reativação freqüente de herpesvírus periodontal pode ser responsável pelo rápido colapso periodontal em alguns pacientes mesmo na presença de pouca placa dental. A ausência de infecção herpesviral ou reação viral pode esclarecer porque algumas pessoas possuem a bactéria enquanto ainda há saúde periodontal ou a presença de mínima doença (KAMMA & SLOTS, 2003).

### **2.3. Tratamento de periodontites**

Em geral, os métodos de tratamento para PA podem ser similares àqueles usados para PC. Estes métodos incluem instrução de higiene oral, reforço e avaliação do controle de placa dos pacientes; raspagem supra e subgingival e alisamento das raízes para remover placa e cálculo; controle de outros fatores locais; terapia local e cirurgia periodontal se necessários; e manutenção periodontal (THE AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2000).

A terapia periodontal inicial isolada é freqüentemente ineficaz. Contudo, em estágios precoces da doença, as lesões podem ser tratadas com terapia antimicrobiana combinada com raspagem e alisamento radicular com ou sem terapia cirúrgica. A identificação microbiana e o teste de sensibilidade podem ser considerados (THE AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2000).

A mera presença de periodontopatógenos putativos no sulco gengival não é suficiente para iniciar ou causar inflamação periodontal. É essencial que haja uma elevação nas proporções relativas tal como a massa crítica presente para montar um efetivo dano tecidual. Mesmo em indivíduos

saudáveis, os periodontopatógenos estão presentes no sulco gengival, embora em baixos números, como membro da microbiota normal residente.

Existe uma variedade de testes diagnósticos microbiológicos para avaliação dos pacientes com doença periodontal. Considerando vantagem e desvantagem de cada teste, com frequência é utilizada a combinação de vários métodos analíticos. Os testes parecem ter grande utilidade quando aplicados a pacientes com PA ou PC que não respondem favoravelmente a terapia mecânica convencional. A identificação de microrganismos periodontopatogênicos no sulco gengival fornece informação para determinação da escolha do agente antimicrobiano. (LOOMER, 2004).

Estudos de Christan *et al.* (2002) mostraram que terapia periodontal tem efeito sistêmico e tem potencial para melhorar a estabilidade do fator de risco cardiovascular.

A necessidade de intervenção cirúrgica no tratamento de PA é controversa. A resposta inflamatória local é caracterizada pelo aumento da liberação de mediadores inflamatórios dos neutrófilos originados dentro do fluido gengival. Os resultados de Buchmann *et al.* (2002a) sugerem que a terapia cirúrgica é um método mais condizente para remoção da etiologia pró-inflamatória.

Antimicrobianos sistêmicos em conjunto com raspagem e alisamento radicular podem oferecer um benefício adicional sobre a utilização somente de raspagem e alisamento radicular no tratamento de periodontites, em termos de nível de inserção clínica e mudança de profundidade de sondagem da bolsa. Contudo, diferenças no estudo de metodologias e a falta de dados impedem uma adequada e completa reunião de dados para uma maior análise compreensiva. Isto dificulta para se estabelecer conclusões definitivas, embora pacientes com bolsas profundas, doença progressiva ou ativa, ou perfil microbiológico específico, podem se beneficiar mais com esta terapia adicional (HERRERA *et al.*, 2002).

Estudos de Buchmann *et al.* (2002b) suportam que ao tratar-se de PA, terapia mecânica/cirúrgica/antimicrobiana é o regime de tratamento apropriado para estabilização a longo prazo da saúde periodontal.

Bons resultados têm sido demonstrados nos casos de tratamento de PA utilizando a combinação de amoxicilina e metronidazol. Estudos relatam

que o uso de metronidazol e amoxicilina seguidos de raspagem e alisamento radicular eliminaram *A. actinomycetemcomitans*. e controlaram *P.gingivalis* nos locais afetados (van WINKELHOFF *et al.*, 1992; TINOCO *et al.*, 1998).

O tratamento de periodontites é bem diferente do tratamento de muitas infecções bacterianas. A microbiota presente é sempre heterogênea e relativamente complexa, e varia significativamente de um paciente para outro. Deve ser enfatizado que o uso de antibióticos não substitui a instrumentação do local a ser tratado. A bactéria subgengival está dentro do biofilme que é relativamente impermeável a qualquer antimicrobiano a menos que seja completamente desorganizado (WALKER & KARPINIA, 2002).

O sucesso do tratamento da PA depende do diagnóstico precoce, direcionamento da terapia contra o agente microbiano infectante e o estabelecimento de um ambiente saudável livre de infecção. É importante que o paciente receba o exame periodontal como parte da visita de rotina ao dentista para um possível diagnóstico precoce, pois o tratamento é complexo e difícil.

#### **2.4. Fatores de virulência de *A. actinomycetemcomitans***

A passagem de um estado comensal para um patogênico, geralmente envolve fatores, sendo que *A. actinomycetemcomitans* produz diversas substâncias que individualmente ou coletivamente podem estar envolvidas no processo da doença (SMITH, 1975). Dentre os diversos fatores de virulência que possibilitam sua permanência na cavidade bucal pode ser citado: fator hemolítico (AVILA-CAMPOS *et al.*, 1988; KATO *et al.*, 1996); uma proteína de aproximadamente 8 kDa que está associada à membrana e apresenta a característica de não ser citotóxica, porém possui capacidade imunogênica e potente ação antiproliferativa sobre os osteoblastos (WHITE *et al.*, 1995); enzimas como fosfatase ácida e alcalina e endotoxina altamente produtora de reabsorção óssea (SLOTS *et al.*, 1980 e NOWONTY *et al.*, 1982). A colagenase de *A. actinomycetemcomitans* é outra enzima que associada a colagenase proveniente dos neutrófilos lisados pela leucotoxina, pode produzir grande destruição tecidual, através da degradação de fibroblastos (ROZANIS *et al.*, 1983).

Os lipopolissacarídeos (LPS) são outros componentes de *A. actinomycetemcomitans* que além de atuarem como mitógenos para linfócitos B com indução de anticorpos policlonais e ativarem a via alternativa do sistema complemento, induzem monócitos e macrófagos a liberarem prostaglandinas e interleucina-1, que estimulam a reabsorção óssea e podem levar à formação das células tipo osteoclastos (GOWEN & MUNDY, 1986; ISHIHARA *et al.*, 1990 e NISHIHARA *et al.*, 1995), desencadeando os fenômenos patológicos que caracterizam a doença periodontal.

Estudos de Rogers *et al.* (2007) demonstraram que injeções orais de LPS derivado de *A. actinomycetemcomitans* podem induzir perda óssea alveolar severa e produção de citocinas pró-inflamatórias em ratos em 8 semanas.

O fator de virulência mais bem caracterizado é a leucotoxina. Possui massa molecular entre 115-180 kDa (TSAI *et al.*, 1984), pode ser inativada a 56°C por 30 minutos ou por ação de proteases (TAICHMAN *et al.*, 1980) e sua purificação pode ser realizada pela associação de cromatografia de troca iônica e por gel filtração (TSAI *et al.*, 1984 e GUAZELI-AMIN, 1998). Este fator de virulência é capaz de destruir leucócitos polimorfonucleares (BAEHNI *et al.*, 1979 e TSAI *et al.*, 1979) e monócitos humanos (TAICHMAN *et al.*, 1980). Pode ser obtida por sonicação de *A. actinomycetemcomitans* (TSAI *et al.*, 1979 e TAICHMAN *et al.*, 1980), por cultivo deste microrganismo com polimixina B que atua na membrana citoplasmática (TSAI *et al.*, 1984), por incubação de *A. actinomycetemcomitans* em água destilada ou soro humano, com liberação desta toxina na forma solúvel (TSAI *et al.*, 1979; TAICHMAN *et al.*, 1980), ou ainda, pelo tratamento de *A. actinomycetemcomitans* com determinadas proteases (OHTA *et al.*, 1991).

Recentemente, foi demonstrado que a leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* é capaz de lisar eritrócitos humanos (BALASHOVA *et al.*, 2006). Como resultado, a lise de eritrócitos mediada por leucotoxina confere atividade beta-hemolítica a bactéria. A lise de eritrócitos é um dos mecanismos pelos quais a bactéria pode adquirir ferro.

Em função desta recente descoberta, levantou-se a hipótese de que a produção de leucotoxina seria regulada também pelo ferro, uma vez que, outras proteínas envolvidas na captação e metabolismo do ferro são também



reguladas por ele. Dessa forma, seguindo este raciocínio, Balashova *et al.* (2006) demonstraram que a secreção de leucotoxina é severamente afetada pela presença de ferro livre no meio. Esta foi a primeira comprovação da regulação da produção e liberação de leucotoxina mediada pelo ferro.

A toxina citoletal (*cdt*) é uma holotoxina secretada por bactérias que induz a interrupção do crescimento de várias células eucarióticas, sendo expressa por *A. actinomycetemcomitans* (SUGAI *et al.*, 1998; MAYER *et al.*, 1999; SHENKER *et al.*, 1999) e aproximadamente 85% dos isolados possuem genes *cdt*, embora haja variações no nível da produção dessa toxina (AHMED *et al.*, 2001; FABRIS *et al.*, 2002; YAMANO *et al.*, 2003). Pacientes com PAL pode exibir anticorpos séricos a *cdt* (MBWANA *et al.*, 2003). É notado que *cdt* de *A. actinomycetemcomitans* pode também ter atividade estimulatória de citocinas, induzindo a produção de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, mas não de TNF- $\alpha$ , IL-12 ou M-CSF pelas células mononucleares do sangue periférico humano (AKIFUSA *et al.*, 2001).

Recentemente tem sido descrita a presença da *cdt* com propriedades imunossupressivas apresentando a capacidade de interferir no ciclo celular das células T humanas. A capacidade de *A. actinomycetemcomitans* de induzir apoptose de linfócitos T humanos ativados, levando a fragmentação de DNA, depende da presença de genes *cdt* (*rCdtABC*) (SHENKER *et al.*, 2001; SHENKER *et al.*, 2006).

Durante o desenvolvimento da doença periodontal, ocorrem reações que tanto podem iniciar como prolongar a inflamação, sendo que as proteases do organismo infectante e do hospedeiro estão envolvidos nestes processos (WANG *et al.*, 1999).

Proteases de bactérias periodonto-patogênicas podem atuar diretamente como ativadores de procolagenases humanas e degradar fragmentos de colágeno. Desta maneira, em conjunto com as enzimas do hospedeiro, as proteases bacterianas podem participar na destruição dos tecidos periodontais (SORSA *et al.*, 1992).

Embora muitos estudos sobre proteases de *Porphyromonas gingivalis* têm sido relatados, pouca atenção tem sido prestada à bactéria *A. actinomycetemcomitans* (WANG *et al.*, 1999). Gazi *et al.* (1997) mostraram

que *A. actinomycetemcomitans* apresenta atividade alanina-lisina específica, mas não conseguiram demonstrar sua natureza.

Já Wang *et al.* (1999) realizaram os primeiros estudos de purificação e caracterização de protease de *A. actinomycetemcomitans*. Purificaram uma serina ou metaloprotease específica de aproximadamente 50 kDa do sobrenadante de cultura e observaram degradação extensa do colágeno tipo I e fibronectina.

Padrões de crescimento celular, síntese de DNA e nível de fibronectina das células epiteliais gengivais quando incubados com protease, apresentaram-se menores que os respectivos valores nas células epiteliais gengivais não tratadas, demonstrando que protease de *A. actinomycetemcomitans* pode inibir a proliferação de células epiteliais gengivais (WANG *et al.*, 2001).

Gregory *et al.* (1992) encontraram em sobrenadante de cultura de *A. actinomycetemcomitans* enzimas proteolíticas capazes de clivar “*in vitro*” IgG, IgA e IgM. Observaram também, uma extensiva degradação de IgG e IgA em amostras de fluido gengival de pacientes com PAL em comparação aos indivíduos periodontalmente saudáveis.

A atividade proteolítica de *A. actinomycetemcomitans* pode ter um papel importante envolvido na desregulação da resposta imune do hospedeiro (O'BRIEN-SIMPSON *et al.*, 2004).

## **2.5. Considerações gerais sobre imunoglobulinas**

Para manter a homeostase dentro da cavidade bucal, vários sistemas da resposta imune, incluindo o sistema salivar, sérico e do tecido gengival, contribuem para o controle da colonização microbiana (MENG *et al.*, 2007).

As imunoglobulinas são produzidas pelo hospedeiro como consequência da exposição aos antígenos, tais como a infecção natural e a vacinação (HAMMARSTRÖM & SMITH, 1986). A IgM é o primeiro anticorpo a aparecer durante a resposta imune e é de curta duração. É efetiva na fixação do complemento. A IgA não fixa complemento e não parece ser boa na opsonização (EBERSOLE, 1990). A IgG é um mediador importante e efetivo da defesa imune. É capaz de ativar o sistema complemento e mediar

a opsonização por ter afinidade a receptores Fc nas células fagocíticas. É a classe mais abundante presente no soro, constituindo aproximadamente 80% do total das imunoglobulinas séricas (KUBY, 2000) e é o isotipo sérico mais predominante durante infecções bacterianas. A IgG1 e IgG2 são produzidas em resposta a antígenos protéicos (tais como hemaglutinina de *P. gingivalis* e vírus), sendo que a IgG2 parece formar uma resposta aos polissacarídeos bacterianos. A principal resposta a anticorpos na periodontite é a IgG2, ocorrendo em resposta a polissacarídeos e proteínas da membrana externa de patógenos periodontais Gram-negativos (EBERSOLE & TAUBMAN, 1994).

Há controvérsias quanto aos dados de nível salivar de imunoglobulinas específicas a *A. actinomycetemcomitans* em pacientes com periodontites. Enquanto alguns autores demonstraram aumento nos níveis de anticorpos em pacientes com periodontites (SANDHOLM *et al.*, 1987), outros não encontraram diferenças (HIDALGO *et al.*, 1998; NAKAGAWA *et al.*, 2001). Segundo Granswinckel *et al.* (2004) os níveis de IgA e IgM não diferem entre pacientes com periodontites e controles, sugerindo que elas não exercem papel principal nas periodontites. Porém não podemos descartar a hipótese de que os níveis de Igs podem ser alterados em função da ação da protease. A clivagem de IgG por *A. actinomycetemcomitans* pode acarretar vantagem aos patógenos na progressão da doença (GREGORY *et al.*, 1992).

## **2.6. Doença periodontal: Modelo experimental em animais**

Embora modelos experimentais em animais tenham limitações, eles são muitas vezes superiores aos estudos *in vitro* e clínicos e servem como uma conexão essencial entre hipóteses e pacientes humanos. A doença periodontal pode ser vista como um processo que envolve 4 etapas principais: colonização bacteriana, invasão, indução destrutiva do hospedeiro no tecido conectivo e processo de reparação que reduz a extensão do colapso do tecido. Os estudos em animais devem ser avaliados quanto a sua capacidade de testar hipóteses específicas e não a sua exatidão a todos os

aspectos de iniciação e progressão da doença periodontal (GRAVES *et al.*, 2008).

Alguns estudos têm sido realizados com ratos para avaliar a reabsorção óssea e analisar a resposta imune inata a periodonto patógenos (DUMITRESCU *et al.*, 2004; KURLAND *et al.*, 2006; ROGERS *et al.*, 2007).

Kesavalu *et al.* (2002), Teng (2002), Garlet *et al.* (2005) e Mahanonda *et al.* (2006) utilizaram camundongos para avaliar a resposta desses animais frente a *A. actinomycetemcomitans*.

Garlet *et al.* (2005) caracterizaram a evolução da doença periodontal induzida por *A. actinomycetemcomitans* em camundongos, mostrando que a inoculação oral dessa bactéria promove a migração de leucócitos para o tecido periodontal e o desenvolvimento de reabsorção do osso alveolar. Neste estudo, também revelaram a expressão de citocinas pró-inflamatórias do tipo-Th1 incluindo TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e IL-12 em tecido periodontais após a infecção, desde estágios iniciais e no decorrer da doença. Cinética similar de expressão foi encontrada para as quimiocinas CCL5, CCL4, CCL3 e CXCL10 e para os receptores CCR5 e CXCR3, todos esses ligados ao padrão Th1. A expressão de mediadores tipo-Th2, como IL-10, CCL1 e seus receptores CCR4 e CCR8 foram detectadas somente após 30 dias da infecção, determinando uma resposta imune tempo-dependente. A expressão de quimiocinas estava diretamente relacionada a presença de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, linfócitos CD4 e CD8 e células B no infiltrado inflamatório.

Estes autores também demonstraram que durante o predomínio da resposta tipo Th1, há um aumento no número de células inflamatórias e intensa perda óssea. Em contraste, após o aumento da expressão de mediadores tipo Th2, o número de células inflamatórias permanece constante. Os dados deste estudo apontam que camundongos sujeitos a inoculação oral de *A. actinomycetemcomitans* representam um modelo adequado para o estudo da doença periodontal. Sugerem também que, a expressão de citocinas e quimiocinas pode dirigir o recrutamento seletivo de subpopulações leucocitárias para o tecido periodontal, o que pode determinar o estacionamento ou progressão natural da lesão.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AKIFUSA, S.; POOLE, S.; LEWTHWAITE, J.; HENDERSON, B.; NAIR, S.P. Recombinant *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin proteins are required to interact to inhibit human cell cycle progression and to stimulate human leukocyte cytokine synthesis. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 69, p. 5925-2930, 2001.

ALALUUSUA, S., ASIKAINEN, S., LAI, C.H. Intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Periodontol.**, Chicago, v.62, p.207-210, 1991.

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

ASIKAINEN, S.; JOUSIMIES-SOMER, H; KANERVO, A.; SUMMANER, P. Certain bacterial species and morphotypes in localized juvenile periodontitis and in matched controls. **J. Periodontol.**, Chicago, v.58, p.224-230, 1987.

ASIKAINEN, S.; ALALUUSUA, S.; SAXEN, L. Recovery of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from teeth, tongue and saliva. **J. Periodontol.**, Chicago, v.62, p.203-206, 1991a.

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

AVILA-CAMPOS, M.J.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.A.R.; DAMASCENO, C.A.V.; CISALPINO, E.O. Atividade hemolítica de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.19, p.262-265, 1988.

BAEHNI, P.; TSAI, C.C.; McARTHUR, W.P.; HAMMOND, B.; TAICHIMAN, N. S. Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. **Infect. Immun.**, Bethesda, v.24, p.233-243, 1979.

BAEHNI, P.C.; TSAI, C.C.; McARTHUR, W.P. Leukotoxic activity in different strains of the *Bacterium actinomycetemcomitans* isolated from juvenile periodontitis in man. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.26, p.271-276, 1981.

BAER, P.N. The case for periodontosis as a clinical entity. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 42, p. 516-520, 1971.

BALASHOVA, N.V.; CROSBY, J.A.; AL GOFAILY, L.; KACHLANY, S.C. Leukotoxin confers beta-hemolytic activity to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 74, p. 2015-2021, 2006.

BUCHMANN, R.; HASILIK,A.; VAN DYKE, T.E.; LANGE, D.E. Amplified crevicular leukocyte activity in aggressive periodontal disease. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.81, p. 716-721, 2002a.

BUCHMANN, R.; NUNN, M.E.; VAN DYKE, T.E.; LANGE, D.E. Aggressive periodontitis: 5-year follow up of treatment. **J. Periodontol.**, Chicago, v.73, p. 675-683, 2002b.

BUTLER, J. A familial pattern of juvenile periodontitis (periodontosis). **J. Periodontol.**, Chicago, v. 40, p. 115-118, 1969.

CALIFANO, J.V.; SCHENKEIN, H.A. TEW, J.G. Immunodominant antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b in early-onset periodontitis patients. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 7, p. 65-70, 1992.

CATON, J. Periodontal diagnosis and diagnostic aids. **The American Academy of Periodontology**, Chicago, v.1, 1989.

CHRISTAN, C.; DIETRICH, C.C.; HÄGEWALD, S.; KAGE, A.; BERNIMOULIN, J-P. White blood cell count in generalized aggressive periodontitis after non-surgical therapy. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 29, p. 201-206, 2002.

CHRISTERSSON, L.A.; ALBINI, B.; ZAMBON, J.J.; WIKESJÖ, U.M.; GENCO, R.J. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v.58, p.529-539, 1987.

CORONADO, O.; MASTROIANNI, A.; CHIODO, F. Anaerobic bacterial infection in HIV disease and AIDS. **AIDS Read**, New York, v.6, p.122-141, 1996.

DOGAN, B.; KIPALEV, A.S.; ÖKTE, E.; SULTAN, N.; ASIKAINEN, S.E. Consistent intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* despite clonal diversity. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 79, p. 307-315, 2008.

DUMITRESCU, A.L.; ABD-EL-ALEEM, S.; MORALES-AZA, B.; DONALDSON, L.F. A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 31, p. 596-603, 2004.

EBERSOLE, J.L. Systemic humoral immune responses in human periodontal disease. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 4, p. 283-331, 1990.

EBERSOLE, J.L.; SANDOVAL, M.N.; STEFFEN, M.J.; CAPPELLI, D. Serum antibody in *A. actinomycetemcomitans*- infected patients with periodontal disease. **Infect. Immun.**, Bethesda, v.59, p.1795-1802, 1991.

EBERSOLE, J.L.; TAUBMAN, M.A. The protective nature of host responses in periodontal diseases. **Periodontol.** 2000, Denmark, v. 5, p. 112-141, 1994.

FINE, D.H.; GOLDBERG, D.; KAROL, R. Caries levels in patients with juvenile periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 55, p. 242-246, 1984.

FINE, D.H.; FURGANG, D.; KAPLAN, J.B.; CHARLESWORTH, J.; FIGURSKI, D.H. Tenacious adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain CU 1000 to salivary-coated hydroxyapatite. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.44, p.1063-1076, 1999a.

FINE, D.H.; FURGANG, D.; SCHREINER, P.; GONCHAROFF, P.; CHARLESWORTH, J.; GHAZWAN, G.; FITZGERALD-BOCARSLY, P.; FIGURSKI, D.H. Phenotypic variation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* during laboratory growth: implications for virulence. **Microbiol.**, Great Britain, v.145, p.1335-1347, 1999b.

FINE, D.H.; FURGANG, D.; GOLDMAN, D. Saliva from subjects harboring *Actinobacillus actinomycetemcomitans* kills *Streptococcus mutans* in vitro. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 78, p. 518-526, 2007.

GARLET, G.P.; AVILA-CAMPOS, M.J.; MILANEZI, C.M.; FERREIRA, B.R.; SILVA, J.S. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. **Microbes Infection**, Paris, v. 7, p. 738–747, 2005.

GARNER, J.G. Isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus* at Auckland Hospital. **New Zealand Med. J.**, Wellington, v.89, p.384-386, 1979.



GAZI, M.I.; COX, S.W.; CLARK, D.T.; ELEY, B.M. Characterization of protease activities in *Capnocytophaga spp*, *Treponema denticola* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.12, p.240-248, 1997.

GMÜR, R.; McNABB, H.; van- STEENBERGEN, T.J.M.; BAEHNI, P.; MOMBELLI, A.; VAN WINKELHOLFF, A.J.; GUGGENHEIN, B. Seroclassification of hitherto nontypeable *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains: evidence for a new serotype e. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.8, p.116-120, 1993.

GOWEN, M.; MUNDY, G.R. Actions of recombinant interleukin-1, interleukin-2 and interferon gamma on bone resorption in vitro. **J. Immunol.**, Baltimore, v.136, p.2478-2482, 1986.

GRANSWINCKEL, J.E.; van der Velden, U.; van Winkelhoff, A.J.; HOEK, F.J.; LOOS, B.G. Plasma antibody levels in periodontitis patients and controls. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 31, p. 562-568, 2004.

GRANT, D.A.; STERN, I. B.; LISTGARTEN, M.A. Early periodontitis. In: *Periodontics*. Mosby, St. Louis, p.383, 1988.

GRAVES, D.T.; FINE, D.; TENG, Y-T.A.; VAN DYKE, T.E.; HAJISHENGALLIS, G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 35, p. 89-105, 2008.

GREGORY, R.L.; KIM, D.E.; KINDLE, J. C.; HOBBS, L.C. Immunoglobulin-degrading enzymes in localized juvenile periodontitis. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v.27, p.176-183, 1992.

GUAZELI-AMIN, V.H. **Análise da atividade leucotóxica de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e do efeito neutralizador de anticorpos anti**

**leucotoxina.** Londrina, 1998. Dissertação de mestrado-Universidade Estadual de Londrina.

HAMMARSTRÖM, L.; SMITH, C.I. IgG subclasses in bacterial infections. **Monogr. Allergy.**, New York, v. 19, p. 122-133, 1986.

HARASZTHY, V.I.; ZAMBIN, J.J.; TREVISAN, M.; ZEID, M.; GENCO, R.J. Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and others forms of early-onset periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 71, p. 912-922, 2000.

HERRERA, D.; SANZ, M.; JEPSEN, S.; NEEDLEMAN, I.; ROLDÁN, S. A systemic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planning in periodontitis patients. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 29, p. 136-159, 2002.

HIDALGO, M.M.; ITANO, E.N.; NAKAGAWA, R.I.; TREVISAN JR, W.; AVILA-CAMPOS, M.J. Doença periodontal : Estudo da resposta imune humoral. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo.**, São Paulo, v.12, p.207-213, 1998.

HILLMAN, J.D.; SOCRANSKY, S.S. Bacterial interference in the oral ecology of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and its relationship to human periodontosis. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 27, p. 75-77, 1982.

HOLT, S.C.; TANNER, A.C.R.; SOCRANSKY, S.S. Morphology and ultrastructure of oral strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 30, p. 588-600, 1980.

ISHIHARA, Y.; ISHIMURA, T.; MAKI, E.; NOGUSHI, T.; KOGA, T. Role of interleukin-1 and prostaglandin in vitro bone resorption induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v.26, p.155-160, 1990.

KAMMA, J.J.; SLOTS, J. Herpesviral-bacterial interactions in aggressive periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 30, p. 420-426, 2003.

KATO, T.; KIMIZUKA, R.; OKUDA, K. Isolation and characterization of hemolytic genes from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.143, p.217-221, 1996.

KAPLAN, J.B.; PERRY M.B.; MACLEAN, L.L.; FURGANG, D.; WILSON, M.E.; FINE, D.H. Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 69, p. 5375-5384, 2001.

KAPLAN, J.B.; FINE, D.H. Biofilm dispersal of *Neisseria subflava* and other phylogenetically diverse oral bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.68, p.4943-4950, 2002.

KAPLAN, J.B.; MEYENHOFER, M.F.; FINE, D.H. Biofilm growth and detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Bacteriol.**, Washington, v.185, p.1399-1404, 2003.

KESAVALU, L.; CHANDRASEKAR, B.; EBERSOLE, J.L. In vivo induction of proinflammatory cytokines in mouse tissues by *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 17, p. 177-180, 2002.

KILLIAN, M.; SCHIOTT, C. R. *Haemophili* and related bacteria in the human oral cavity. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.20, p.791-796, 1975.

KUBY, J. **Immunology**. 3<sup>th</sup>. New York, U.S.A.: W.H. Freeman, 2000.

KURLAND, A.R.; SCHREINER, H.; DIAMOND, G. In vivo beta-defensin gene expression in rat gingival epithelium in response to *Actinobacillus*

*actinomycetemcomitans* infection. **J. Periodontol. Res.**, Copenhagen, v. 41, p. 567-572, 2006.

LANG, N.; BARTOLD, P.M.; CULLIAN, M.; JEFFCOAT, M.; MOMBELLI, A.; MURAKAMI, S.; PAGE, R.; PAPAPANOU, P.; TONETTI, M.; van DYKE, T. Consensus report: aggressive periodontitis. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v.4, p.53, 1999.

LINDHE, J.; RANNEY, R.; LAMSTER, I.; CHARLES, A.; CHUNG, C.P.; FLEMMIG, T.; KINANE, D.; LISTGARTEN, M.; LÖE, H.; SCHOOR, R.; SEYMOUR, G.; SOMERMAN, M. Consensus report: chronic periodontitis. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v.4, p.38, 1999.

LISTGARTEN, M.A.; LAI, C.H.; EVLAN, C.I. Comparative antibody titers to *Actinobacillus actinomycetenicomitans* in juvenili periodontitis, chrornic periodontitis and periodontallys healthy subjects. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.8, p.155-164, 1981.

LOOMER, P.M. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. **Periodontol. 2000**, Denmark, v. 34, p. 49-56, 2004.

MAHANONDA, R.; POTHIRAKSANON, P.; SA-AD-IAM, N.; YAMAZAKI, K.; SCHIFFERLE, R.E.; HIRUNPETCHARAT, C.; YONGVANICHIT, K.; PICHYANGKUL, S. The effects of *Porphyromonas* LPS and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* LPS on human dentritic cells in vitro, and in mouse model in vivo, **Asian Pac. J. Allergy Immunol.**, Bangkok, v. 24, p. 223-228, 2006.

MAYER, M.P.A.; BUENO, L.C.; HANSEN, E.J.; DiRIENZO, J.M. Identification of a cytolethal distending toxin gene locus and features of a virulence-associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 67, p. 1227-1237, 1999.

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

MCARTHUR, W.P.; STROUP, S.; WILSON, L. Detection and serotyping of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates on nitrocellulose paper blots with monoclonal antibodies. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.13, p.684-681,1986.

MENG, H.; XU, L.; LI, Q.; HAN, J. ZHAO, Y. Determinants of host susceptibility in aggressive periodontitis. **Periodontol. 2000**, Denmark, v. 43, p. 133-159, 2007.

MEYER, D.H.; FIVES-TAYLOR, P.M. Evidence that extracellular components function in adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. **Infect. Immun.**, Bethesda, v.61, p.4933-4936, 1993.

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

MOMBELLI, A.; GMÜR, R.; GOBBI, C.; LANG, N.P. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adult periodontitis. II Characterization of isolated strains and effect of mechanical periodontal treatment. **J. Periodontol.**, Chicago, v.65, p.827-834, 1994.

MORRIS, J.F.; SEWELL, D.L. Necrotizing pneumonia caused by mixed infection with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinomyces israelii*: case report and review. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.18, p.450-452, 1994.

MURRAY, P.A.; GRASSI, M.; WINKLER, J.R. The microbiology of HIV-associated periodontal lesions. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.16, p.636-642, 1989.

NAKAGAWA, R.I.; GUAZELI-AMIN, V.H.; HIDALGO, M.M.; TREVISAN JR, W.; ITANO, E.N. Anticorpos anti-leucotoxina contra *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em amostras de soro e saliva de pacientes com Periodontite Juvenil Localizada. **Pesq. Odontol. Bras.**, São Paulo, v.15, p. 5-11, 2001.

NAKANISHI, F.A.; AVILA-CAMPOS, M.J.; KAMIJI, N.H.; ITANO, E.N. Immunoglobulin G proteolytic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Braz. J. Microbiol.**, Rio de Janeiro, v. 37, p. 42-46, 2006.

NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G.; ZAMBON, J.J. Periodontal disease. In: NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G. **Oral Microbiol. Immunol.** Philadelphia W.B. Saunders, p.360-384, 1994.

NISHIHARA, T.; UEDA, N.; AMANO, K.; ISHIHARA, Y.; HAYAKAWA, H.; KUROYANAGI, T.; AHSAKI, Y.; NAGATA, K.; NOGUCHI, T. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 capsular-polysaccharide-like polysaccharide promotes osteoclast-like cell formation by interleukin-1 alpha production in mouse marrow cultures. **Infect. Immun.**, Bethesda, v.63, p.1893-1898, 1995.

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

NOWOTNY, A.; BEHLING, U.H.; HAMMOND, B.; LAI, C.H.; LISTGARTEN, M.; PHAM, P. H.; SANAVI, F. Release of toxic microvesicles by *A. actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, Bethesda, v.37, p.151-154, 1982.

O'BRIEN-SIMPSON, N.M.; VEITH, P.D.; DASHPER, S.G.; REYNOLDS, E.C. Antigens of bacteria associated with periodontitis. **Periodontol.** 2000, Denmark, v. 35, p. 101-134, 2004.

OHTA, H.; KATO, K.; KOKEGUCHI, S.; HARA, H.; FUKUI, K.; MURAYAMA, Y. Nuclease- sensitive binding of an *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin to the bacterial cell surface. **Infect. Immun.**, Bethesda, v.59, p.4599-4605, 1991.

PAGE, R.C.; VANDESTEEN, G.E.; EBERSOLE, J.L.; WILLIAMS, B.L.; DIXON, I.L.; ALTMAN, L.C. Clinical and laboratory studies of a family with a high prevalence of juvenile periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v.56, p.602-609, 1985.

PALENSTEIN-HELDERMAN, W.H van. Microbiol etiology of periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.8, p.261-280, 1981.

PREUS, H.R.; OLSEN, I. Possible transmittance of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from a dog to a child with rapidly destructive periodontitis. **J. Period. Res.**, Copenhagen, v.23, p.68-71, 1988.

PULVERER, G.; KO, H.L. *Actinobacillus actinomycetem-comitans*: fermentative capabilities of 140 strains. **Appl. Microbiol.**, Washington, v. 20, p. 693-695, 1970.

QUERIDO, S.M.R.; DOTTO, P.P.; AQUINO, D.T.R.; CORTELLI, J.R. Aspectos clínicos, radiográficos e microbianos de uma família com expressiva prevalência de doença periodontal. **Rev. Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS**, v. 21, p. 163-171, 2006.

RAMS, T.E.; ANDRIOLO, M.; FEIK, D.; ABEL, S.N.; MCGIVERN, T.M.; SLOTS, J. Microbiol study of HIV- related periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v.62, p.74-81, 1991.

ROGERS, J.E.; LI, F.; COATNEY, D.D.; ROSSA, C.; BRONSON, P.; KRIEDER, J.M.; GIANNOBILE, W.V.; KIRKWOOD, K.L. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 78, p. 550-558, 2007.

ROZANIS, J.; van WART, H.E.; BOND, M.D.; SLOTS, J. Further studies on collagenase of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 62, p.300, 1983.

SAGLIE, F.R. Bacterial invasion and its role in the pathogenesis of periodontal disease. In: HAMADA, S.; HELT, S.C., MCGHEE, J.R., (eds.) **Periodontol disease: pathogens & host immune responses**. Tokyo: Quintessence Publishing Co., p.27-40, 1991.

SAKURAI, K.; WANG, D.; SUZUKI, J.; UMEDA, M.; NAGASAWA, T.; IZUMI, Y.; ISHIKAWA, I.; ISOBE, M. High incidence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection in acute coronary syndrome. **Int. Heart. J.**, Tokyo, v. 48, p. 663-675, 2007.

SANDHOLM, L.; TOLO, K.; OLSEN, I. Salivary IgG, a parameter of periodontal disease activity? **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.14, p.289-294, 1987.

SCRENIVASAN, P.K.; MEYER, D.H.; FIVES-TAYLOR, P.M. Factors influencing the growth and viability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.8, p.361-369, 1993.

SHENKER, B.J.; MCKAY, T.L.; DATAR, S.; MILLER, M.; CHOWHAN, R.; DEMUTH, D. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* immunosuppressive protein is a member of the family of cytolethal distending toxins capable of



causing a G2 arrest in human T cells. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 162, p. 4773-4780, 1999.

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

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

SLOTS, J.; REYNOLDS, H.S.; GENCO, R.J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. **Infect. Immun.**, Bethesda, v.29, p.1013-1020, 1980.

SLOTS, J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 15, p. 606-609, 1982.

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

SLOTS, J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* In; NISENGARD, R.J. & NEWMAN. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, p.218-227,1994.

SMITH, H. Gram-negative bacteria: the determinants of pathogenicity. In: URBANSCHKEK, R.; NETER, E. (eds.) **Gram-negative bacterial infections**

**and mode of endotoxin actions: pathophysical, immunological and clinical aspects.** New York, Springer Verlag, p. 8-15, 1975.

SORSA, T.; INGMAN, T.; SUOMALAINEN, K.; HAAPASALO, M.; KONTTINEN, Y.T.; LINDY, O.; SAARI, H.; UITTO, V.J. Identification of proteases from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast- type interstitial collagenases. **Infect. Immun.**, Bethesda, v.60, p.4491-4495, 1992.

SUGAI, M.; KAWAMOTO, T.; PÉRÈS, S.Y. Cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytolethal distending toxin. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 66, p. 5008-5019, 1998.

TAICHMAN, N.S.; DEAN, R.T.; SANDERSON, C.J. Biochemical and morphological characterization of the killing of human monocytes by a leukotoxin derived from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, **Infect. Immun.**, Bethesda, v.28, p.258-268, 1980.

TENG, Y.T. Mixed periodontal Th1-Th2 cytokine profile in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-specific osteoprotegerin ligand (or RANK-L)-mediated alveolar bone destruction in vivo. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 70, p. 5269-5273, 2002.

THE AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Parameter on aggressive periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 71, p. 867-869, 2000.

TIHA, K.; TAKEUCHI, Y.; UMEDA, M.; HUANG, Y.; OHNISHI, M; ISHIKAWA, I. Identification of periodontopathic bacteria in gingival tissue of Japanese periodontitis patients. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 22, p. 201-207, 2007.

TINOCO, E.M.; BELDI, M.I.; LOUREIRO, C.A.; LANA, M.; CAMPEDELLI, F.; TINOCO, N.M.; GJERMO, P.; PREUS, H.R. Localized juvenile periodontitis and

*Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a Brazilian population. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v.105, p.9-14, 1997.

TINOCO, E.M.; BELDI, M.I.; CAMPEDELLI, F. Clinical and microbiological effects of adjunctive antibiotics in treatment of localized juvenile periodontitis. A controlled clinical trial. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 69, p. 1355-1363, 1998.

TSAI, C.C.; McARTHUR, W.P.; BAEHNI, P.C.; HAMOND, B.F.; TAICHMAN, N.S. Extraction and partial characterization of a leukotoxin from a plaque-derived Gram-negative microorganism. **Infect. Immun.**, Bethesda, v.25, p.427-439, 1979.

TSAI, C.C.; SHENKER, B.J.; DIRIENZO, J.M.; MALAMUD, D.; TAICHMAN, N.S. Extraction and isolation of a leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* with polymyxin B. **Infect. Immun.**, Bethesda, v.43, p.700-705, 1984.

van-STEENBERGEN, T.J.; BOSCH-TIJHOF, C.J.; van WINKELHOFF, A.J.; GMÜR, R.; DE GRAFF, J. Comparison of six typing methods for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.32, p.2769-2774, 1994.

van WINKELHOLFF, A.J.; TIJHOF, C.J.; DE GRAAFF, J. Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxicillin therapy in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 63, p. 52-57, 1992.

WALKER, C. & KARPINIA, K. Rationale for use of antibiotics in periodontics. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 71, p. 1188-1196, 2002.

WANG, P.L.; SHIRASU, S.; SHINOHARA, M.; DAITO, M.; FUJII, T.; KOWASHI, Y.; OHURA, K. Purification and characterization of a tripsin-like protease from the culture supernatant of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v.107, p.147-153, 1999.

WANG, P.L.; AZUMA, Y.; SHINOHARA, M.; OHURA, K. Effect of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* protease on the proliferation of gingival epithelial cells. **Oral Dis.**, Copenhagen, v.7, p.233-237, 2001.

WHITE, P.A.; WILSON, M.; NAIR, S.P.; KIRBY, A.C.; REDDI, K.; HEDERSON, B. Characterization of an antiproliferative surface-associated protein from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* which can be neutralized by sera from proportion of patients with Localized Juvenile Periodontitis. **Infect. Immun.**, Bethesda, v.63, p.2612-2618, 1995.

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

YAPAR, M.; SAYGUN, I.; ÖZDEMİR, A.; KUBAR, A.; SAHİN, S. Prevalence of human herpesviruses in patients with aggressive periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 74, p. 1634-1640, 2003.

ZAMBON, J.J.; CHRITERSSON, L.A.; SLOTS, J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. **J. Periodontol.**, Chicago, v.54, p.707-711, 1983a.

ZAMBON, J.J.; SLOTS, J.; MIYASAKI, K.; LINZER, R.; COHEN, R.; LEVINE, M.; GENCO, R.L. Purification and characterization of the serotype c antigen from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, Bethesda, v.44, p.22-27, 1983b.

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

ZAMBON, J.J.; REYNOLDS, H.S.; GENCO, R.J. Studies of the subgingival microflora in patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. **J. Periodontol.**, Chicago, v.61, p.699-704, 1990.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GERAL

Obter anticorpos policlonais para análise de protease de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* à imunoglobulina G em periodontites e infecção experimental em camundongos.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Obter anticorpos policlonais anti-protease de *A. actinomycetemcomitans* à IgG em coelho e em camundongo.

-Caracterizar parcialmente os anticorpos policlonais anti-protease de *A. actinomycetemcomitans* contra IgG.

-Determinar as concentrações de protease contra IgG em sobrenadante de cultivo de isolados clínicos de *A. actinomycetemcomitans* (isolados de pacientes com PAL e PUN/SIDA) e de cepa de referência ATCC 43718, por ELISA.

-Determinar o nível de IgG anti-protease de *A. actinomycetemcomitans* à IgG em amostras de salivas de pacientes com periodontite agressiva localizada e indivíduos saudáveis por ELISA.

-Analisar efeito de sobrenadante de cultivo de *A. actinomycetemcomitans* sobre o nível de IgG anti-leucotoxina em amostras de salivas de pacientes com periodontite agressiva localizada por ELISA.

-Determinar nível de protease à IgG circulante no decorrer da infecção bucal em camundongos com *A. actinomycetemcomitans*.

-Determinar os níveis de protease contra IgG nos tecido gengival palatal, coração e cérebro de camundongos infectados por inoculação bucal de *A. actinomycetemcomitans* por ELISA captura.

-Determinar nível de IgG anti-protease contra IgG circulante no decorrer da infecção bucal em camundongos com *A. actinomycetemcomitans*.

## **5. ARTIGO 1**

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS PARA ANÁLISE DE  
PROTEASE À IgG EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Aggregatibacter  
actinomycetemcomitans* E DE NÍVEL SALIVAR DE IgG ESPECÍFICA**



## 5.1. RESUMO

A protease com capacidade de degradar imunoglobulina G é um importante mecanismo de evasão de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. O presente trabalho teve como objetivo obter e utilizar os anticorpos policlonais para a análise de protease à IgG humana em isolados de *A. actinomycetemcomitans* e avaliar nível de IgG anti-protease além de analisar o efeito de sobrenadante de cultivo de *A. actinomycetemcomitans* no nível salivar de IgG específica. Foram obtidos inicialmente anticorpos policlonais de coelho e de camundongos por imunização com a fração cromatográfica de sobrenadante de cultura de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 com atividade de protease. Os anticorpos obtidos foram analisados por western blotting (WB) e por cromatografia em coluna de sephadex G-150. Utilizando esses anticorpos policlonais foram determinados os níveis de protease em amostras de sobrenadante de cultivo de isolados provenientes de pacientes

com periodontite agressiva localizada (PAL) e com periodontite ulcerativa necrotizante associada à síndrome da imunodeficiência adquirida (PUN/SIDA), por ELISA. Adicionalmente foi realizada a análise de nível de IgG anti-protease em amostras de salivas de pacientes com PAL e controles saudáveis e o efeito de sobrenadante de cultura de cepa de referência (ATCC 43718) no nível de IgG anti-leucotoxina em salivas de pacientes com PAL utilizando ELISA indireto. Os resultados obtidos demonstraram que os anticorpos interagem com antígeno de ~50kDa por WB, sendo capazes reconhecerem as frações cromatográficas contendo atividade de protease. Por ELISA, foi observado que os níveis de protease à IgG são similares entre os isolados provenientes de pacientes com PAL e PUN/SIDA. Por ELISA indireto foi observado nível significativamente mais elevado de IgG anti-protease em salivas de pacientes com PAL em relação ao grupo saudável e após a incubação de salivas com sobrenadante de cultura houve decréscimo no nível de IgG específica em todas as amostras analisadas. Concluímos pelos resultados obtidos que a protease presente no sobrenadante de cultura de *A. actinomycetemcomitans* possivelmente apresenta MM de ~50 kDa, que os níveis de protease à IgG são heterogêneos sendo os níveis similares entre os isolados provenientes de pacientes com PAL e PUN/SIDA. Observou-se também que o nível de IgG anti-protease salivar encontra-se elevado em pacientes com PAL e que os níveis de anticorpos específicos podem sofrer decréscimo pela atuação de proteases presentes em sobrenadante de cultivo de *A. actinomycetemcomitans*, sugerindo potencial desse microrganismo em alterar título de anticorpos na saliva.

**PALAVRAS-CHAVES:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, protease, imunoglobulina G, periodontites, SIDA.



## 5.2. ABSTRACT

The protease to immunoglobulin G is an important host's immune evasion mechanism of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. The objective of present work was to produce polyclonal antibodies to *A. actinomycetemcomitans* protease and to use these antibodies for the protease dosage in clinical isolates and additionally to evaluate the salivary IgG anti-protease levels and also for the effect of culture supernatants in salivary specific IgG level. Initially, rabbit and mice polyclonal antibodies were obtained by using protease fraction (*A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 sephadex G-150 chromatography fractions) and analyzed by western blotting (WB) and by chromatography fractions interactions. The levels of protease were determined in *A. actinomycetemcomitans* culture supernatants (*A. actinomycetemcomitans* isolated from localized aggressive periodontitis (LAP), with necrotizing ulcerative periodontitis associated to acquired immunodeficiency syndrome (NUP/AIDS) and reference (ATCC 43718), by using these polyclonal antibodies in ELISA capture. Additionally salivary IgG anti-protease level and the effect of Aa ATCC 43718 culture supernatant in the level of IgG anti-leucotoxin were determined by indirect ELISA. The results showed the antibodies interaction with ~50kDa antigen by WB, and also recognition of protease active chromatography fractions. By ELISA, it was observed protease levels are similar between clinical isolated of LAP and PUN/AIDS group. Also higher IgG anti-protease level was detected in the PAL salivary samples in relation to healthy group by indirect ELISA. According to expected after the incubation of saliva with culture supernatants it was observed decreased specific IgG level. In conclusion, the *A. actinomycetemcomitans* protease to IgG possibly presents MM of ~50 kDa, the levels of protease are heterogeneous being the similar levels between isolated originating from patients with LAP and NUP/AIDS. Also the salivary IgG anti-protease is increased in LAP patients and the specific salivary

antibodies levels can be decreased by soluble proteases presents in *A. actinomycetemcomitans* culture supernatants, suggesting potential of this microorganism in altering title of antibodies in the saliva.

**KEYWORDS:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, protease, immunoglobulin G, periodontitis, AIDS.

### 5.3. INTRODUÇÃO

As características destrutivas e progressivas das doenças periodontais são mantidas na presença de biofilme bacteriano subgingival e podem estar associadas a grupos específicos de bactérias. Dados clínicos revelam as doenças periodontais são as maiores responsáveis pela perda de dentes, devido a sua natureza clínica indolor. Somente nos últimos estágios, com a presença de bolsas periodontais profundas e mobilidade dental acentuada, ela é percebida (Machion *et al.*, 2000). A interação dos periodontopatógenos com o sistema imune do hospedeiro determina a extensão da destruição periodontal.

A periodontite agressiva localizada (PAL) é uma forma de periodontite que progride rapidamente e envolve uma perda óssea extensa ao redor dos incisivos e primeiros molares (PAGE *et al.*, 1985; LANG, *et al.*, 1999) e está frequentemente associada à *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* (NØRSLOV-LAURITSEN & KILIAN, 2006), um cocobacilo gram negativo, anaeróbio facultativo, não móvel (ZAMBON, 1985). Está presente também em pacientes com doença periodontal associada à síndrome da imunodeficiência adquirida (DP/SIDA) (MURRAY *et al.*, 1989; ZAMBON *et al.*, 1990; RAMS *et al.*, 1991).

Essa bactéria produz diversos fatores de virulência, tais como a leucotoxina da família RTX que destrói neutrófilos e monócitos (ZAMBON, 1985; CHRISTERSSON *et al.*, 1987; VAN-STEENBERG *et al.*, 1994; HENDERSON *et al.*, 2003), e a bacteriocina que exerce um papel ecológico importante na regulação da microbiota oral intra e inter-específica

(HAMMOND *et al.*, 1986; LIMA *et al.*, 2002). Anticorpos produzidos contra esses componentes podem ser benéficos para o hospedeiro, mas *A. actinomycetemcomitans* produz proteases que clivam imunoglobulinas (GREGORY *et al.*, 1992; NAKANISHI *et al.*, 2006) e fatores que podem inibir a produção de Igs de células B humanas (SHENKER *et al.*, 1990) e a resposta linfoproliferativa (VALE *et al.*, 2004).

Nível significativo de IgG tem sido considerado importante na prevenção de doenças periodontais em pacientes com periodontite agressiva (PA) (CHEN *et al.*, 1991; QUINN *et al.*, 1996). O papel de proteção da IgG é fortemente manifestada no confinamento das lesões nos primeiros molares e incisivos na PAL (RANNEY *et al.*, 1982; GUNSOLLEY *et al.*, 1987).

Considerando que possivelmente o controle e a progressão da PAL depende da modulação da resposta imune, se torna importante a investigação dos fatores de virulência de *A. actinomycetemcomitans*, principalmente os que afetam o sistema de defesa do hospedeiro. Assim, o presente trabalho teve como objetivo obter e utilizar os anticorpos policlonais para a análise de protease à IgG humana em isolados clínicos de *A. actinomycetemcomitans* e avaliar nível de IgG anti-protease além de efeito de sobrenadante de cultivo de *A. actinomycetemcomitans* no nível salivar de IgG à leucotoxina.

## **5.4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.4.1. PACIENTES E INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Pacientes da Clínica de Periodontia, do Departamento de Medicina Oral e Odontologia Infantil (MOOI), da Universidade Estadual de Londrina foram selecionados por um especialista, com base nos dados obtidos após a anamnese, exame clínico e radiográfico. Todos os pacientes portadores de PAL apresentavam evidências clínicas e radiográficas de perda óssea alveolar localizadas nos primeiros molares e incisivos permanentes.

Tanto o grupo de indivíduos saudáveis como de pacientes não foi submetido ao tratamento com antibióticos durante os 3 meses anteriores à coleta do material.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, sob nº 288/05.

### **5.4.2. OBTENÇÃO DE AMOSTRAS SALIVARES**

A coleta de amostras de salivas de pacientes e indivíduos saudáveis foi realizada segundo HIDALGO *et al.* (1998) e aliquotadas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o uso.

A coleta das amostras foi realizada após esclarecimento e assinatura do termo de consentimento das pessoas participantes deste estudo.

### **5.4.3. MICRORGANISMO**

*A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 sorotipo b, 9 isolados de pacientes com PAL (P9, P15, P23, P24, P28, P35, P36, P37, P45) e 22 isolados de pacientes com periodontite ulcerativa necrotizante associado a SIDA (PUN/SIDA) (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A10, A11, A12, A13, A14, A15, A16, A17, A18, A19, A20, A21, A22, A23) foram cultivados em meio caldo infuso cérebro-coração (BHI) (Biobrás, Montes Claros, MG, Brasil) suplementado com 0,5% de extrato de levedura em condições de microaerofilia e incubadas a 37° C por 72 horas, para obtenção do sobrenadante de cultura e de extrato sonicado.

### **5.4.4. OBTENÇÃO DE SOBRENADANTE DE CULTURA**

Amostras de sobrenadante de todos isolados e da cepa de referência foram obtidas por centrifugação da cultura de *A. actinomycetemcomitans* (Hitachi, Himac CR 21, Japão) a 10.000 x g, por 20 minutos a 4°C. A concentração protéica dos sobrenadantes foi determinada utilizando o método de Lowry *et al.* (1951) e mantidos a -80°C até o uso.

### **5.4.5. CROMATOGRAFIA EM COLUNA *Sephadex G-150***

Amostras de 2 ml de sobrenadante de cultura de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 foram aplicadas em coluna de *Sephadex G-150* equilibrada com tampão salina-fosfato (PBS) 0,15 M, pH7,2. Frações foram coletadas em coletor automático de frações e analisadas a 280 nm (Ultrospec-200 Pharmacia Biotech UV/Visible). Foram selecionadas frações contendo a protease à IgG (NAKANISHI *et al.*, 2006) para as imunizações de coelho e camundongos. As frações obtidas também foram utilizadas para a análise de atividade de protease e de reconhecimento de anticorpos policlonais por ELISA.



#### **5.4.6. OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-PROTEASE DE *A. actinomycetemcomitans* À IgG EM COELHO E EM CAMUNDONGO**

Amostras de 200 µg e 100 µg/proteína de fração de protease à IgG foram inoculadas subcutaneamente em coelhos e camundongos, respectivamente. A primeira imunização foi realizada com adjuvante completo de Freund (Sigma, St. Louis, MO, USA), (800 µl para coelho e 50 µl para camundongo) v/v com amostra de fração de protease à IgG, e depois a intervalos de duas semanas (2° e 3° dose) utilizando adjuvante incompleto (Sigma, St. Louis, MO, USA). As amostras de soros imunes foram fracionadas em coluna de *Sepharose* proteína G (Sigma, St. Louis, MO, USA) para purificação de IgG. Os animais foram manuseados conforme orientação do Biotério Central/UEL e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina sob nº. 58/05.

#### **5.4.7. ANÁLISE DE ANTICORPOS DE COELHO ANTI-PROTEASE E ANÁLISE DE PROTEASE DAS FRAÇÕES DE CROMATOGRAFIA (*SEPHADEX G-150*)**

Para a análise de interação de anticorpos com frações de cromatografia, as placas de ELISA foram inicialmente sensibilizadas com as amostras de frações obtidas, incubando-se a 37°C por 1 hora, seguida de 18 horas a 4°C. Após o bloqueio por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente e lavagens as amostras foram incubadas com de IgG de coelho anti-protease. Após novas lavagens a reação foi revelada com conjugado peroxidase anti-IgG de coelho e substrato orto-feniletlenodiamino diidrocloreto (OPD), com leitura a 492nm realizada com leitor ELISA Multiskan EX (Uniscience – Labsystems, Helsinki, Finland). As frações com os valores maiores de D.O foram expressas como ++++. Para a análise de atividade de protease as placas foram sensibilizadas com IgG humana purificada (2,5 µg/ml) e a seguir com frações da cromatografia *Sephadex G-150* por 24 horas a 37°C. O meio BHI e PBS 0,15M foram utilizados como controle. A reação foi incubada com conjugado peroxidase anti-IgG humana

(1:4000) (A-8775, Sigma, St. Louis, MO, USA) e revelada com OPD com leitura a 492nm. A atividade de protease foi determinada em porcentagem de degradação, considerando 100% de não degradação com meio BHI, conforme Nakanishi *et al.* (2006) e as frações com maior atividade de degradação expressas como +++\*.

#### **5.4.8. ANÁLISE DE ANTICORPOS POLICLONAIS POR WESTERN BLOTTING**

Amostra de sobrenadante de cultura de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 com atividade proteolítica sobre IgG foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5-20% com sulfato dodecil de sódio (SDS-PAGE), juntamente com os padrões de massa molecular 176.5, 113.7, 80.9, 63.8, 49.5, 37.4, 26.0, 19.6, 14.9, 8.4 kDa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) utilizando tampão tris-glicina, 0,5 M, pH 8,2. A seguir foi realizada a transferência em nitrocelulose (18 horas, 22 Volts). A membrana foi bloqueada com tampão de bloqueio (leite desnatado 5%, Tween 20 0.5%, diluídos em PBS 0,15 M) por 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, foi lavada com tampão lavagem (leite desnatado 0.5%, Tween 20 0.05%, diluídos em PBS 0,15 M), recortada em tiras e tratadas com IgG de coelho e de camundongo anti-fração com atividade de protease (diluída a 1/10) por 2 horas a 37°C. Posteriormente, foram feitas novas lavagens e as tiras foram incubadas com conjugado peroxidase anti-IgG de coelho (A-1949, Sigma, St. Louis, MO, USA) e de camundongo (A-8924, Sigma, St. Louis, MO, USA) respectivamente por 1 hora a 37°C. Após a adição da solução de diaminobenzidine (DAB) (Sigma, St. Louis, MO, USA), a reação foi interrompida com água destilada.

#### **5.4.9. ELISA CAPTURA PARA DETECÇÃO DE PROTEASE NOS SOBRENADANTES DE DIFERENTES ISOLADOS DE *A. actinomycetemcomitans* E NA CEPA DE REFERÊNCIA ATCC 43718**

A sensibilização da placa de ELISA foi realizada com a IgG de coelho anti-protease de *A. actinomycetemcomitans* à IgG na concentração de 50 µg/ml diluído em tampão carbonato-bicarbonato (100 µl/orifício) e incubada a

37°C por 1 hora, seguida de 18 horas a 4°C. Após o bloqueio por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente, foi seguido de 4 lavagens. Posteriormente, a placa foi incubada com amostras (100 µl) de sobrenadantes de diferentes isolados de *A. actinomycetemcomitans* e da cepa de referência ATCC 43718 (11mg/ml) em triplicata e incubada a 37°C por 2 horas. Como controle, foram utilizadas proteases de *A. actinomycetemcomitans* à IgG nas concentrações de 75, 150, 300 e 600 µg/ml (curva de conversão). Realizadas novas lavagens, a placa foi incubada com IgG de camundongo anti-protease de *A. actinomycetemcomitans* na concentração de 30 µg/ml a 37°C por 2 horas. Após a incubação e as 4 lavagens da placa, foi adicionado 100µl do conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo (A-8924, Sigma, St. Louis, MO, USA ) (1:8000) e incubada por 2 horas a 37°C. A revelação foi realizada com OPD, seguida de leitura a 492 nm. As leituras em D.O. a 492 nm foram convertidas em µg/ml baseando-se nos valores obtidos pelos padrões de concentração conhecida, utilizando curva de conversão. A transformação foi realizada pelo programa Curve Expert 1.3.

#### **5.4.10. ANÁLISE DE IgG SALIVAR ANTI-PROTEASE DE *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 À IgG POR ELISA**

A placa de ELISA foi sensibilizada com 100 µl/orifício da fração de protease de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 à IgG humana (40 µg/ml) diluído em tampão carbonato-bicarbonato e incubada a 37°C por 1 hora, seguida de 18 horas a 4°C. Após o bloqueio (leite desnatado 5% e Tween 20 0,5%, diluído em PBS 0,15 M) por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente, foi seguido de 4 lavagens (leite desnatado 0,5% diluído em PBS 0,15 M). Posteriormente, a placa foi incubada com amostras de salivas de pacientes com PAL (n=19) e de indivíduos sem PAL (n=19) (1:40) em triplicata a 37°C por 2 horas. Após a incubação e as 4 lavagens da placa, foi adicionado 100µl do conjugado peroxidase anti-IgG humano (A-8775, Sigma, St. Louis, MO, USA) (1:4000) e incubada por 1 hora e 30 minutos a 37°C. A revelação foi realizada com o OPD (Sigma, St. Louis, MO, USA) e interrompida com solução de ácido sulfúrico 4 N. A leitura da placa

foi realizada em leitor ELISA Multiskan EX (Uniscience – Labsystems, Helsinki, Finland) a  $\lambda=492$  nm.

#### **5.4.11. OBTENÇÃO DE FRAÇÃO DE LEUCOTOXINA**

Inicialmente foram obtidas amostras de extrato sonicado por meio de centrifugação de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 (centrífuga: Himac CR 21: Hitachi, Japão) a 10.000 x g durante 20 minutos, a 4°C, seguida de 3 lavagens em solução de salina-fosfato tamponada (PBS), 0,15 M, pH 7,2. Após re-suspensão em PBS 0,15 M foi sonicada segundo SUZUKI *et al.*, (1984), e modificado quanto ao número e duração dos ciclos necessários, que foram em média de 30 (50 volts), de um minuto ligado com intervalo de 2 minutos desligados em tubo imerso em gelo triturado. A ruptura das células foi verificada por microscopia e a suspensão sonicada centrifugada a 10.000 x g durante 20 minutos a 4°C. A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Lowry *et al.* (1951). Amostras de 2 ml de extratos sonicados foram aplicadas em coluna de *Sephadex* G200 (2 X 50 cm) equilibrada com PBS 0,15 M. Frações foram coletadas em coletor automático de frações (1 ml em cada tubo) e analisadas a 280nm (Ultrospec-200 Pharmacia Biotech UV/Visible). Foi considerada como fração contendo a leucotoxina, as frações de aproximadamente 150 kDa baseadas em resultados obtidos anteriormente (GUAZELI-AMIN *et al.*, 1998 e NAKAGAWA, *et al.*, 2000).

#### **5.4.12. ANÁLISE DE IgG SALIVAR ANTI-LEUCOTOXINA PRÉ-TRATADA COM SOBRENADANTE DE *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 POR ELISA**

A placa de ELISA foi sensibilizada com 100  $\mu$ l/orifício de leucotoxina (40  $\mu$ g/ml) diluído em tampão carbonato-bicarbonato e incubada a 37°C por 1 hora, seguida de 18 horas a 4°C. Após o bloqueio por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente, foi seguido de 4 lavagens. Posteriormente, a placa foi incubada por 2 horas a 37°C com amostras de salivas de pacientes com PAL (n=19) (triplicata) pré-incubadas cada uma por 2 horas a 37°C com meio BHI e com sobrenadante de cultura *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718. Após a incubação e as 4 lavagens da placa, foi adicionado 100  $\mu$ l do conjugado peroxidase anti-IgG humano (A-8775, Sigma, St. Louis, MO, USA)

(1:4000) e incubada por 1 hora e 30 minutos a 37°C. A revelação foi realizada com o OPD e leitura a  $\lambda=492$  nm.

#### **5.4.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para análise estatística dos resultados de ELISA foi utilizado o teste t. Considerando estatisticamente significantes os resultados com valores  $p<0,05$ .

### **5.5. RESULTADOS**

#### **5.5.1. ANÁLISE DE REATIVIDADE DE ANTICORPOS ANTI-PROTEASE E DE ATIVIDADE DA PROTEASE, UTILIZANDO FRAÇÕES DE CROMATOGRAFIA, POR ELISA**

O processo de fracionamento do sobrenadante de cultura de *A. actinomycetemcomitans* por coluna *Sephadex* G-150, resultou no perfil espectrofotométrico mostrada na figura 1. As frações obtidas apresentaram reatividade com anticorpos policlonais e atividade proteolítica por ELISA nas frações correspondentes (+++ e +++\*). +++ representam as frações que interagiram com os anticorpos resultando em maiores valores de D.O. a 492nm e +++\* representam as frações com maior atividade de degradação.

### **5.5.2. ANÁLISE DE ANTICORPOS POLICLONAIS OBTIDOS POR WESTERN BLOTTING**

Os resultados obtidos demonstraram reconhecimento de uma banda de aproximadamente 50 kDa em amostra de sobrenadante de cultivo de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 à IgG por *Western blotting* como mostrado na figura 2.

### **5.5.3. ELISA CAPTURA PARA DETECÇÃO DE PROTEASE NOS SOBRENADANTES DE DIFERENTES ISOLADOS DE *A. actinomycetemcomitans* E NA CEPA DE REFERÊNCIA ATCC 43718**

Os resultados obtidos demonstraram heterogeneidade na concentração de protease em sobrenadantes de isolados clínicos de *A. actinomycetemcomitans*, sendo em maior concentração no grupo de isolados de pacientes com PAL ( $108 \pm 87 \mu\text{g protease/ml}$ ) do que dos provenientes de pacientes com PUN/SIDA ( $82 \pm 50 \mu\text{g protease/ml}$ ), porém estatisticamente não significativo ( $p > 0.05$ ). Em termos de porcentagem, de 9 isolados de PAL, 7 amostras apresentaram valores maiores que  $25 \mu\text{g/ml}$  de protease (77,8%), e de 22 isolados de PUN/AIDS, 16 amostras apresentaram valores maiores que  $25 \mu\text{g/ml}$  de protease (72,7%). A cepa de referência ATCC 43718 demonstrou  $138 \mu\text{g/ml}$  de protease (Figura 3).

### **5.5.4. ANÁLISE DE IgG SALIVAR ANTI-PROTEASE DE *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 À IgG DE PACIENTES COM PAL POR ELISA**

Os resultados obtidos mostram níveis significativamente elevados de IgG salivar anti-protease de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 à IgG

no grupo de pacientes com PAL ( $0,312 \pm 0,226$ ) em relação ao grupo controle constituído de indivíduos saudáveis ( $0,046 \pm 0,009$ ),  $p < 0.05$  (Figura 4), com variação em D.O a 492nm de 0,106 a 0,870 entre as amostras de pacientes com PAL (Figura 5).

#### **5.5.5 ANÁLISE DE IgG SALIVAR ANTI-LEUCOTOXINA PRÉ-TRATADA COM SOBRENADANTE DE *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 POR ELISA**

A análise dos níveis de IgG salivar anti-leucotoxina pré-tratada com sobrenadante de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 mostrou uma redução estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação as amostras pré-tratadas com meio BHI. (Tabela 1).

## **5.6. DISCUSSÃO**

Em estudo anterior foi detectada uma fração obtida por cromatografia de sobrenadante de cultivo de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718, em coluna de sephadex G-150, com atividade de protease à IgG (NAKANISHI *et al.*, 2006) e a partir dessa fração foram obtidos anticorpos policlonais de coelho e camundongo.

Para melhor caracterização dos anticorpos, foi realizado teste de neutralização, porém a ação neutralizante de anticorpos anti-protease não foi detectada, possivelmente pela própria ação da protease sobre a IgG que tenha formado complexo Ag-Ac (dados não mostrados). Todavia os anticorpos obtidos foram considerados específicos à protease por reconhecerem justamente as frações contendo atividade de protease. A análise desses anticorpos por western blotting demonstrou reconhecimento de antígeno de ~50kDa de *A. actinomycetemcomitans*.

Utilizando esses anticorpos policlonais foram determinados os níveis de protease em amostras de sobrenadante de cultivo de isolados clínicos de *A. actinomycetemcomitans*. Os isolados que apresentaram concentração de protease acima de 25 µg protease/ml foram considerados como bom produtor de protease à IgG. Essa concentração foi baseada na atividade ótima de 27 µg de proteína/ml de sobrenadante de cultivo de cepa de referência (ATCC 43718) obtida por Nakanishi *et al.*, (2006). Considerando que no sobrenadante de cultivo contêm além de protease outras proteínas liberadas pelo *A. actinomycetemcomitans*, acreditamos que todos os isolados analisados apresentem atividade de protease, como também já demonstrado em outro trabalho (NAKANISHI *et al.*, 2008, submetido).

A média de concentração de protease foi maior no grupo proveniente de pacientes com PAL em relação aos isolados de pacientes com PUN/SIDA, todavia estatisticamente não significativo. Esse resultado pode ser devido a heterogeneidade no nível dessa protease, requerendo avaliação de um grupo maior de amostragem. De forma concordante, Kamiji (2007) demonstrou nível de leucotoxina mais elevado em isolados de pacientes com PAL em relação ao PUN/SIDA. Assim, os isolados clínicos de *A. actinomycetemcomitans* de pacientes com PAL possivelmente liberem os fatores de virulência em maior concentração, enquanto que os isolados de PUN/SIDA libera em menor concentração, mas de forma mais constante.



Como a presença de protease em consequência da infecção pelo *A. actinomycetemcomitans* poderia induzir resposta imune específica a protease, no presente trabalho foi realizada também a análise de nível de IgG a protease em amostras de salivas de pacientes com PAL. Os resultados obtidos demonstraram nível significativamente mais elevado de IgG anti-protease de *A. actinomycetemcomitans* em grupo de salivas de pacientes com PAL em relação ao grupo saudável, e também foi observada heterogeneidade no nível de IgG anti-protease. Essa heterogeneidade pode ser devido aos vários fatores do hospedeiro, como fator genético, idade, contato prévio com os antígenos (KUBY, 2000), mas também dos fatores do microrganismo. Dentre esses, a protease poderia influenciar o nível de IgG, tanto degradando a IgG do hospedeiro como também dependendo da expressão do mesmo induzindo maior ou menor resposta imune. De forma concordante, tanto o nível de protease de isolados como o nível de IgG anti-protease foram heterogêneos.

Considerando que a presença de *A. actinomycetemcomitans* que produza alta concentração de protease poderia afetar o título de Igs G específicas a outros antígenos de *A. actinomycetemcomitans*, no presente trabalho também foi avaliado o efeito de sobrenadante de cultura de cepa de referência (ATCC 43718) no nível de IgG anti-leucotoxina em amostras de salivas de pacientes com PAL. Nessa avaliação, todas as amostras analisadas demonstraram decréscimo no nível de IgG específica, o que sugere a potencialidade das proteases presentes em fluidos biológicos interferirem nos níveis de Igs.

Assim, os níveis salivares de imunoglobulinas específicas não concordantes como de Sandholm *et al.* (1984) e Taubman *et al.* (1982) que observaram aumento enquanto que outros estudos não observaram diferenças significativas entre os pacientes e controles. (SINGI *et al.*, 1982; MONCADA *et al.*, 1986; RUBIRA *et al.*, 1993 e HIDALGO *et al.*, 1998), pode ser decorrente tanto da ação de protease, sem descartar também a ação de outros fatores de virulência que induzem a imunossupressão (CELLEN *et al.*, 2006; SHENKER *et al.*, 2006).

Concluimos pelos resultados obtidos que a protease presente no sobrenadante de cultura de *A. actinomycetemcomitans* possivelmente

apresenta MM ~de 50 kDa, que os níveis de protease à IgG são heterogêneos e que isolados provenientes de pacientes com PUN/SIDA liberam em maior concentração a protease que de PAL. Observou-se também que o nível de IgG anti-protease salivar encontra-se elevado em pacientes com PAL e que os níveis de anticorpos específicos podem sofrer decréscimo pela atuação de proteases presentes em sobrenadante de cultivo do microrganismo, sugerindo potencial desse microrganismo em alterar título de anticorpos na saliva.

## 5.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHEN, H.A.; JOHNSON, B.D.; SIMS, T.J. Humoral immune responses to *Porphyromonas gingivalis* before and following therapy in rapidly progressive periodontitis patients. **J. Periodontol.**, v. 62, p. 781-791, 1991.

CELLEN, L.M.; DECOSTERE, A.; DUCATELLE, R. Cytolethal distending toxin generates cell death by inducing a bottleneck in the cell cycle. **Microbiol. Res.**, v. 161, p.109-120, 2006.

CHRISTERSSON, L.A.; ALBINI, B.; ZAMBON, J.J.; WIKESJÖ, U.M.; GENCO, R.J. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis.I. Light immunofluorescence and electron microscopic studies. **J. Periodontol.**, v. 58, p. 529-539, 1987.

GUAZELI-AMIN, V.H. **Análise da atividade leucotóxica de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e do efeito neutralizador de anticorpos anti-leucotoxina.** Londrina, 1998. Dissertação de Mestrado-Universidade Estadual de Londrina.

GUNSOLLEY, J.C.; BURMEISTER, J.A.; TEW, J.G; BEST, A.M.; RANNEY, R.R. Relationship of serum antibody to attachment level patterns in young adults and juvenile periodontitis or generalized severe periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 58, p. 314-320, 1987.

GREGORY, R.L.; KIM, D.E.; KINDLE, J. C.; HOBBS, L.C. Immunoglobulin-degrading enzymes in localized juvenile periodontitis. **J. Periodont. Res.**, v. 27, p.176-183, 1992.

HAMMOND, B.F.; LILLARD, S.E.; STEVENS, R.H. A bacteriocin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, v. 55, p. 686-691, 1986.

HENDERSON, B.; NAIR, S.P.; WARD, J.M.; WILSON, M. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 57, p. 29-55, 2003.

HIDALGO, M.M.H.; ITANO, E.N.; NAKAGAWA, R.I.; TREVISAN JR., W.; AVILA-CAMPOS, M.J. Doença periodontal: Estudo da resposta imune humoral. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v. 12, p. 207-213, 1998.

KAMIJI, N.H. **Nível de leucotoxina em isolados clínicos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* utilizando anticorpos monoclonais e policlonais**. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, 2007.

KUBY, J. **Immunology**. 3<sup>th</sup>. New York, U.S.A.: W.H. Freeman, 2000.

LANG, N.; BARTOLD, P.M.; CULLIAN, M.; JEFFCOAT, M.; MOMBELLI, A.; MURAKAMI, S.; PAGE, R.; PAPAPANOU, P.; TONETTI, M.; VAN DYKE, T. Consensus report: aggressive periodontitis. **Ann. Periodontol.**, v.4, n.1, p.53, 1999.

LIMA, F.L.; FARIAS, F.F.; COSTA, J.E.; CARVALHO, M.A.R.; ALVIANO, C.S.; FARIAS, L.M. Bacteriocin production by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from the oral cavity of humans with periodontal disease, periodontally healthy subjects and marmosets. **Res. Microbiol.**, v. 153, p. 45-52, 2002.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MACHION, L.; FREITAS, P.M.; CESAR NETO, J.B. NOGUEIRA FILHO, G.R.; NOTICI JR, F.H. A influência do sexo e da idade na prevalência de bolsas periodontais. **Pesq. Odontol. Brás.**, v. 14, p. 33-37, 2000.

MONCADA, A.M.; ROCHA, R.S.S.; ROSA, O.P.S.; MARQUES, A.L.V.; MORAES, N. Determinação quantitativa da imunoglobulina G no tecido gengival de pacientes portadores de gengivite e periodontite através da imunodifusão radial simples. **Estomat. Cult.**, v. 16, p. 9-13, 1986.

MURRAY, P.A.; GRASSI, M.; WINKLER, J.R. The microbiology of HIV-associated periodontal lesions. **J. Clin. Periodontol.**, v.16, p.636-642, 1989.

NAKAGAWA, R.I. **Atividade leucotóxica de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sobre a linhagem celular P3U1 e anticorpos anti-fração de leucotoxina em soros de pacientes com periodontite juvenil localizada.** Londrina, 2000. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

NAKANISHI, F.A.; AVILA-CAMPOS, M.J.; KAMIJI, N.H.; ITANO, E.N. Immunoglobulin G proteolytic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Braz. J. Microbiol.**, v. 37, p. 42-46, 2006.

NAKANISHI, F.A. AVILA-CAMPOS, M.J.; ITANO, E.N. Immunoglobulin G proteolytic activity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolated from periodontal patients. **Oral Braz. Res.** (submetido em 2008).

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

PAGE, R.C.; VANDESTEEN, G.E.; EBERSOLE, J.L.; WILLANS, B.L.; DIXON, I.L.; ALTMAN, L.C. Clinical and laboratory studies of a family with a high prevalence of juvenile periodontitis. **J. Periodontol.**, v.56, p.602-609, 1985.

QUINN, S.M.; ZHANG, J.B.; GUNSOLLEY, J.C.; SCHENKEIN, J.G.; SCHENKEIN, H.A.; TEN, J.G. Influence of smoking and race on immunoglobulin subclass concentration in early onset periodontitis patients. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2500-2505, 1996.

RAMS, T.E.; ANDRIOLO, M.; FEIK, D.; ABEL, S.N.; MCGIVERN, T.M.; SLOTS, J. Microbiol study of HIV- related periodontitis. **J. Periodontol.**, v.62, p.74-81, 1991.

RANNEY, R.R.; YANNI, N.R.; BURMEISTER, J.A.; TEW, J.G. Relationship between attachment loss and serum antibody to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adolescents and young adults having severe periodontal destruction. **J. Periodontol.**, v.53, p. 1-7, 1982.

RUBIRA, I.R.F.; ROSA, O.P.S.; ROCHA, R.S.S.; REIS, M.A. Anticorpos séricos IgG anti-*Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 e 29523 em indivíduos com diferentes condições periodontais. **Revista da F.O.B.**, v. 1, p. 30-35, 1993.

SANDHOLM, L.; GROMBLAD, E. Salivary immunoglobulins in patients with juvenile periodontitis and their healthy siblings. **J. Periodontol.**, v. 55, p. 9-12, 1984.

SHENKER, B.J.; VITALE, L.A.; WELHAM, D.A. Immune suppression induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: Effects on immunoglobulin production by human cells B. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 3852-3862, 1990.

SHENKER, B.J.; DEMUTH, D.R.; ZEKAVAT, A. Exposure of lymphocytes to high doses of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending

toxin induces rapid onset of apoptosis-mediated DNA fragmentation. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 74, p. 2080-2092, 2006.

SINGI, L.M.; SILVA, O.P.; GASPARINI, O.T.; MORAES, N.; MARQUES, A.L.V. Quantificação de IgA na saliva total de parótida de indivíduos normais e de portadores de periodontite. Estudo comparativo. **Estomat. Cult.**, v. 12, p. 95-102, 1982.

SUZUKI, J.B.; PARK, S.K.; FALKER, JR, W.A. Immunologic profile of juvenile periodontitis. I. Lymphocyte blastogenesis and the autologous mixed lymphocyte response. **J. Periodontol.**, v.55, p.453-460, 1984.

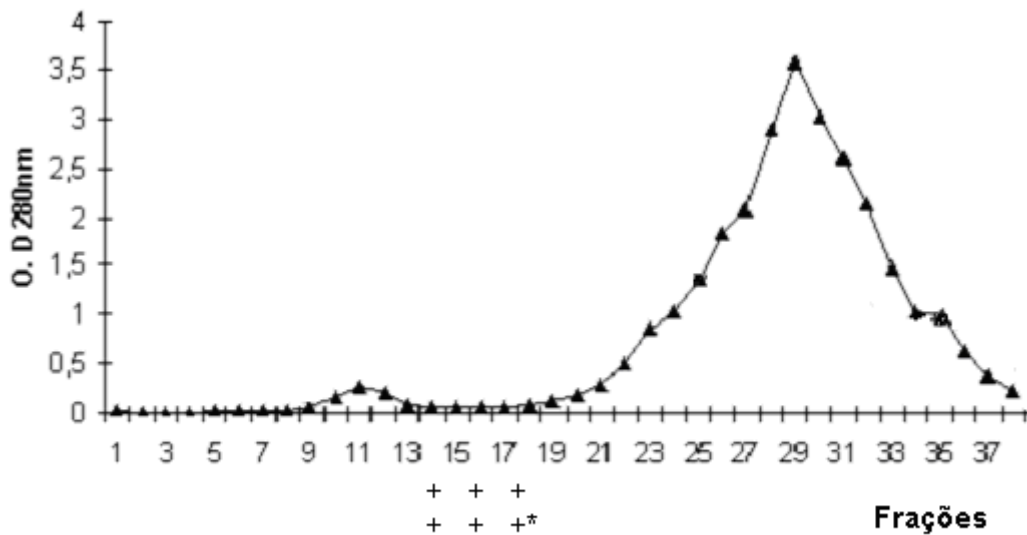
TAUBMAN, M.A.; EBERSOLE, J.L.; SMITH, D.J. Association between systemic and local antibody and periodontal disease. **American. Soc. Microbiol.**, p. 283-289, 1982.

VALE, C.H.B.; FRAGA, L.A.O; COSTA, A.S.; TAVARES, C.A.P.; MARTINS-FILHO, O.A.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.A.R. Antiproliferative activity by *Actinobacillus (Haemophilus) actinomycetemcomitans* and *Fusobacterium nucleatum* in peripheral blood mononuclear cells. **Res. Microbiol.**, v. 155, p. 731-740, 2004.

VAN-STEENBERG, T.J.; BOSCH-TIJHOF, C.J.; VAN WINKELHOFF, A.J.; GMÜR, R.; GRAFF, J. Comparison of six typing methods for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 2769-2774, 1994.

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

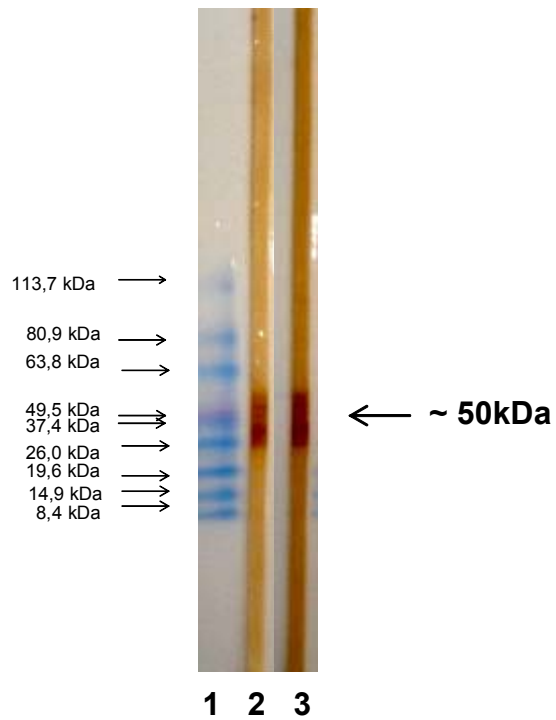
ZAMBON, J.J.; REYNOLDS, H.S.; GENCO, R.J. Studies of the subgingival microflora in patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. **J. Periodontol.**, v.61, p.699-704, 1990.



**Figura 1. Perfil espectrofotométrico de sobrenadante de cultivo de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718.**

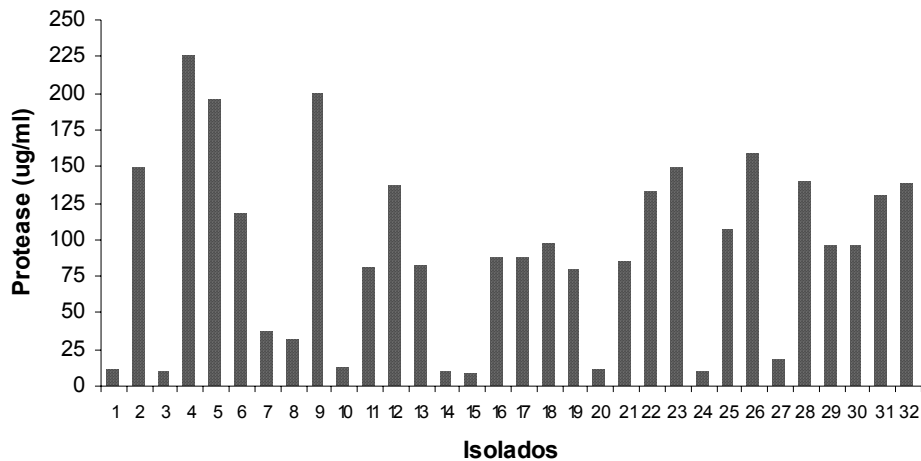
As frações obtidas foram analisadas por ELISA utilizando anticorpos policlonais de coelho à protease e os resultados com valores maiores de DO a 492nm expressos em +++, indicando as frações mais reativas com os anticorpos policlonais de coelho. Essas frações também foram analisadas em teste de degradação de IgG humana por ELISA e as frações que apresentaram maior atividade de protease expressos como +\*\*\*, indicando as frações com maior atividade de protease.





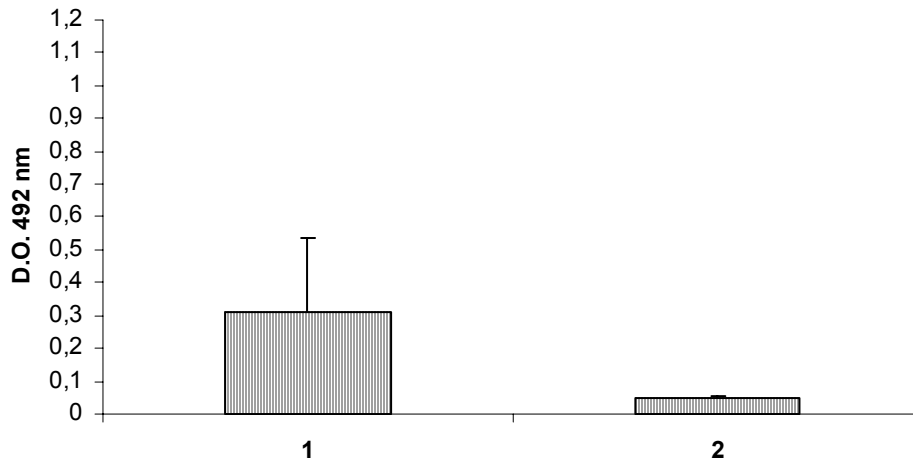
**Figura 2. Resultado da análise por Western blotting.** Sobrenadante de cultura de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 foi submetida a eletroforese e transferida para membrana de nitrocelulose e incubada com IgG de coelho e

- 1) Padrão de massa molecular;
- 2) Sobrenadante de cultura + IgG de camundongo anti-protease à IgG;
- 3) Sobrenadante de cultura + IgG de coelho anti-protease à IgG.

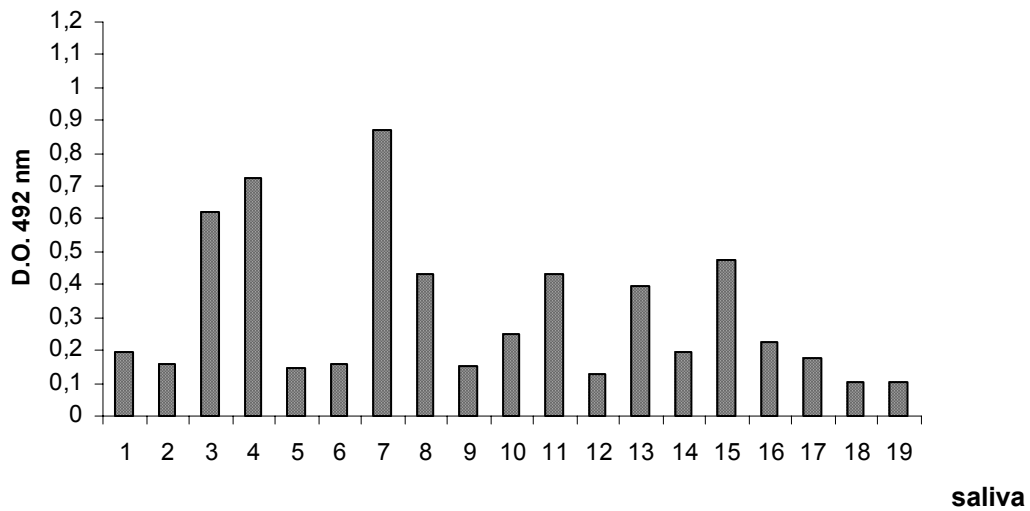


**Figura 3. Nível de protease à IgG de sobrenadantes de cultura de isolados de *A. actinomycetemcomitans* e da cepa de referência ATCC 43718 por ELISA captura.** Placas de ELISA foram sensibilizadas com IgG de coelho anti-protease e incubadas com sobrenadantes de cultura de isolados de *A. actinomycetemcomitans* e com a cepa de referência ATCC 43718, em triplicata. Posteriormente, foi adicionada IgG de camundongo anti-protease de *A. actinomycetemcomitans*. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g/ml}$ .

- 1 a 9) Protease à IgG de isolados de pacientes com PAL;
- 10 a 31) Protease à IgG de pacientes com PUN/AIDS;
- 32) Protease à IgG da cepa de referência ATCC 43718.



**Figura 4. Nível de IgG anti-protease de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 á IgG em grupo de amostras de salivas de pacientes com PAL e grupo controle.** Placas de ELISA foram sensibilizadas com frações de protease à IgG e incubadas com 19 amostras de saliva provenientes de pacientes com PAL (1) e com 19 amostras de salivas de indivíduos periodontalmente saudáveis (2) em triplicata. Os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O.) a  $\lambda=492\text{nm}$ , considerando  $p<0,05$  estatisticamente significativa.  $1 \times 2 = p<0,05$



**Figura 5. Nível de IgG anti-protease de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 á IgG em amostras de salivas de pacientes com PAL.** Placas de ELISA foram sensibilizadas com frações de protease à IgG e incubadas com 19 amostras de saliva provenientes de pacientes com PAL, em triplicata. Os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O.) a  $\lambda=492\text{nm}$ .

**TABELA 1. Nível de IgG salivar anti-leucotoxina de pacientes com PAL tratados e não tratados com sobrenadante de cultura de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 detectados por ELISA (Teste t  $p<0,05$ ).**

<b>Salivas</b>	<b>Não tratada (<math>\lambda=492\text{nm}</math>)</b>	<b>Tratada (<math>\lambda=492\text{nm}</math>)</b>
<b>1</b>	0,384	0,228
<b>2</b>	0,351	0,218
<b>3</b>	0,338	0,179
<b>4</b>	0,369	0,265
<b>5</b>	0,171	0,088
<b>6</b>	0,187	0,087
<b>7</b>	0,547	0,460
<b>8</b>	0,536	0,379
<b>9</b>	0,236	0,100
<b>10</b>	0,243	0,100
<b>11</b>	0,508	0,366
<b>12</b>	0,301	0,109
<b>13</b>	1,055	0,299
<b>14</b>	0,195	0,066
<b>15</b>	0,871	0,202
<b>16</b>	0,262	0,113
<b>17</b>	0,171	0,088
<b>18</b>	0,120	0,104
<b>19</b>	0,195	0,125
<b>Média</b>	0,371	0,185
<b>Desvio padrão</b>	0,246	0,111

## **6. ARTIGO 2**

**NÍVEL LOCAL E SISTÊMICO DE PROTEASE DE *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* CONTRA IMUNOGLOBULINA G NA INFECÇÃO BUCAL EM CAMUNDONGOS BALB/C**

## 6.1. RESUMO

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* é um cocobacilo, gram negativo, anaeróbio facultativo freqüentemente associado à periodontite agressiva localizada, podendo também estar associado a endocardites. O objetivo do presente trabalho foi avaliar nível de protease à imunoglobulina G, fator de virulência que afeta a resposta imune, no decorrer da infecção experimental em camundongos. Os camundongos BALB/c foram infectados por inoculação bucal de *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 43718 sorotipo b) e os níveis de protease à IgG determinados em tecidos gengival palatal, cardíaco e cerebral além de plasmático, por ELISA captura, nos dias 15, 30 e 60 pós-infecção. Adicionalmente foi determinado nível plasmático de IgG anti-protease à IgG por ELISA indireto. Os resultados obtidos demonstraram níveis significativamente elevados de protease à IgG em tecidos e no plasma de animais infectados em relação ao grupo não infectado. Na fase inicial da infecção (15dias) foi observado nível significativamente maior de protease na gengiva palatal em relação ao período de 30 e 60 dias pós-infecção. Por outro lado níveis cardíaco e cerebral foram maiores em 60 dias pós-infecção em relação aos períodos anteriores. Aumento significativo no nível plasmático de IgG anti-protease também foi observado no grupo infectado em relação ao grupo controle, sendo em nível maior no período de 15/30 que 60 dias pós-infecção. Concluimos pelo trabalho que a infecção bucal de camundongos com *A. actinomycetemcomitans* induz aumento no nível de protease à IgG, tanto localmente como de forma sistêmica e, se esse aumento interfere na diminuição de IgG específica à *A. actinomycetemcomitans* no decorrer da infecção, requer estudos adicionais.

**PALAVRAS-CHAVES:** IgG, ELISA, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, protease contra IgG, antígeno solúvel, tecido cardíaco.

## 6.2. ABSTRACT

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is a Gram-negative cocco-bacilli, facultative anaerobic and frequently associated to localized aggressive periodontitis and also associated to endocarditis. The objective of the present work was to evaluate the level of protease to immunoglobulin G, virulence factor that affects the immune response, in the course of the experimental infection in mice. BALB/c mice were infected by *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 43718 serotype b) oral inoculation and the protease levels determined in palatal, cardiac and cerebral tissues and also plasmatic levels by ELISA capture, at 15, 30 and 60 days post-infection (p.i). Additionally IgG anti-protease to IgG level was determined by indirect ELISA. The results demonstrated significantly increased levels of protease to IgG in plasma and animals infected tissues in relation to not infected group. In the initial phase of the infection (15 days) it was observed significantly increased protease level in the palatal tissue in relation to 30 and 60 days p.i. On the other hand cardiac and cerebral levels were higher in 60 than 15, 30 days p.i. Also significantly IgG anti-protease increased levels were observed in plasma of infected group, more evident in 15/30 than 60 days p.i. In conclusion, the oral *A. actinomycetemcomitans* mice infection induces local as systemic increase in the protease level and, if this increased level interferes in the reduction of specific IgG to *A. actinomycetemcomitans* in the course of the infection, require additional studies.

**KEYWORDS:** IgG, ELISA, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, protease to IgG, soluble antigen, cardiac tissue



### 6.3. INTRODUÇÃO

*Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* (NØRSLOV-LAURITSEN & KILIAN, 2006) é um cocobacilo, Gram-negativo, microaerófilo, não móvel, que foi isolado pela primeira vez em 1912 por Klinger de actinomicose cérvico-facial (ZAMBON, 1985). Pode ser classificado em 6 distintos sorotipos baseados na superfície de polissacarídeos localizados na cadeia O do lipolissacarídeo (SAARELA *et al.*, 1992; GMÜR *et al.*, 1993; KAPLAN *et al.*, 2001).

Na etiologia das doenças periodontais, *A. actinomycetemcomitans* é predominante na periodontite agressiva localizada (PAL), antigamente denominada periodontite juvenil localizada (ARMITAGE *et al.*, 1999), já que foi detectado em mais de 90% desses pacientes (ZAMBON *et al.*, 1983; SLOTS & GENCO, 1984; ZAMBON, 1985). A PAL é uma forma de periodontite de rápida progressão, envolvendo perda óssea extensa ao redor dos incisivos e primeiros molares em estágios localizados da doença (GENCO *et al.* 1986). É considerado um periodontopatógeno porque desempenha uma associação fundamental entre a resposta imune, fatores de virulência e efeito de eliminação (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1992).

Esse patógeno também tem impactos na endocardite e abscessos cerebrais (GARNER, 1979; GERACI *et al.*, 1980; PATUREL *et al.*, 2004). Tem sido isolado de placas ateroscleróticas, sugerindo que há uma ligação entre a bactéria e doenças cardiovasculares (HARASZTHY *et al.*, 2000). Recentes estudos também sugerem que periodontites podem estar associadas com o aumento de doenças arteriais periféricas (CHEN *et al.*, 2007).

*A. actinomycetemcomitans* produz diversos fatores de virulência, tais como atividade proteolítica à imunoglobulina G (IgG) (GREGORY *et al.*,

1992; NAKANISHI *et al.*, 2006) que pode interferir na resposta imune e consequentemente ser um fator importante de escape do sistema de defesa do hospedeiro.

Considerando que em geral a disseminação dos diversos agentes infecciosos depende da competência imunológica do hospedeiro (KUBY, 2000) e também dos fatores de virulência relacionados aos mecanismos de escape respectivos e considerando o possível envolvimento de *A. actinomycetemcomitans* em doenças cardiovasculares, se torna importante a investigação de protease à IgG, como um dos fatores envolvidos com o sistema de defesa.

O objetivo do presente trabalho foi determinar nível de protease à imunoglobulina G local e sistêmico no decorrer da infecção experimental em camundongos BALB/c infectados oralmente com *A. actinomycetemcomitans* e adicionalmente avaliar a resposta imune humoral específica.

## **6.4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.4.1. ANIMAIS**

Camundongos BALB/c machos de 56 dias (aproximadamente 25g) foram mantidos no Biotério de Imunologia do Departamento de Ciências Patológicas, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina, à temperatura constante de 25°C e alimentados *ad libitum* com ração e água esterilizados.

### **6.4.2. MICRORGANISMO**

*A. actinomycetemcomitans* (ATCC 43718 sorotipo b) foi crescido sob condições de microaerofilia em meio ágar soja tripticaseína bacitracina-vancomicina (TSBV) (Biobrás, Montes Claros, MG, Brasil) enriquecido com 0,5% de extrato de levedura (Biobrás, Montes Claros, MG, Brasil) como previamente descrito (AVILA-CAMPOS *et al.*, 1988) para a infecção dos camundongos. Paralelamente, a bactéria também foi cultivada em meio caldo infuso cérebro-coração (BHI) (Biobrás, Montes Claros, MG, Brasil) suplementado com 0,5% de extrato de levedura em condições de microaerofilia e incubadas a 37° C por 72 horas, para obtenção do sobrenadante de cultura.

### **6.4.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

Camundongos (n = 24) foram divididos em quatro grupos: a) GRUPO I: infectado com *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 e sacrificados após 15 dias da última inoculação; b) GRUPO II: infectado e sacrificado após 30 dias da última inoculação; c) GRUPO III: infectado e sacrificado após 60 dias da última inoculação; e d) GRUPO IV: controle, não infectado (inoculados com tampão salina-fosfato (PBS) 0,15M esterelizado) e sacrificados 15, 30 e 60 dias pós-inoculação. Inicialmente, os animais receberam uma injeção direta de  $1 \times 10^9$  células de *A. actinomycetemcomitans* diluídas em 10  $\mu$ l de PBS 0,15 M no tecido gengival palatal do segundo molar. Imediatamente após,  $1 \times 10^9$  células de *A. actinomycetemcomitans* diluídas em 100  $\mu$ l de PBS 0,15 M foram colocadas na cavidade bucal do camundongo, sendo que este procedimento foi repetido após 48 e 96 horas. Os controles foram submetidos ao mesmo procedimento com PBS 0,15 M de acordo com Garlet *et al.* (2005). Após os períodos citados, foram coletadas amostras de sangue e a seguir eutanasiados com éter etílico para a retirada dos seguintes tecidos: gengiva palatal, coração e cérebro.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina sob nº. 68/07.

#### **6.4.4. OBTENÇÃO DE FRAÇÃO DE PROTEASE À IgG POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA *Sephadex G-150***

O sobrenadante de cultivo contendo protease à IgG foi obtido por meio de centrifugação da cultura de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 (Himac CR 21: Hitachi, Japão) a 10.000 x g, por 20 minutos a 4°C. A concentração protéica do sobrenadante foi determinada utilizando o método de Lowry *et al.* (1951). Amostras de 2 ml de sobrenadante de cultura (11 mg/ml) foram aplicadas em coluna de *Sephadex G-150* equilibrada com PBS 0,15 M. Frações foram coletadas em coletor automático de frações (1 ml em cada tubo) e analisadas a 280 nm (Ultrospec-200 Pharmacia Biotech UV/Visible). Foi considerada como fração contendo a protease à IgG, as frações baseada em resultados obtidos anteriormente (NAKANISHI *et al.*, 2004).

#### **6.4.5. OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-PROTEASE DE *A. actinomycescomitans* À IgG EM COELHO E EM CAMUNDONGO**

Amostras de 200µg e 100 µg/proteína de fração de protease à IgG foram inoculadas subcutaneamente em coelhos e camundongos, respectivamente. A primeira imunização foi realizada com adjuvante completo de Freund (Sigma, St. Louis, MO, USA), (800µl para coelho e 50µl para camundongo) v/v com amostra de fração de protease à IgG, e depois a intervalos de duas semanas (2° e 3° dose) utilizando adjuvante incompleto (Sigma, St. Louis, MO, USA). As amostras de soros imunes foram fracionadas em coluna de *Sepharose* proteína G (Sigma, St. Louis, MO, USA) para purificação de IgG. Os animais foram manuseados conforme orientação do Biotério Central/UEL e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina sob nº. 58/05.

#### **6.4.6. ELISA CAPTURA PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENO EM AMOSTRAS DE TECIDOS**

Inicialmente amostras de tecidos foram maceradas com 400 µl de PBS 0,15 M esterizado em placa de 24 orifícios utilizando gaze e êmbolo de seringa descartável de 3 ml esterelizados. Os sobrenadantes foram coletados para análise. A sensibilização da placa de ELISA foi realizada com a IgG de coelho anti-protease de *A. actinomycescomitans* à IgG na concentração de 50 µg/ml diluído em tampão carbonato-bicarbonato (100 µl/orifício) e incubada a 37°C por 1 hora, seguida de 18 horas a 4°C. Após o bloqueio por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente, foi seguido de 4 lavagens. Posteriormente, a placa foi incubada com amostras (100 µl) de tecidos maceradas em triplicata e incubada a 37°C por 2 horas. Realizadas novas lavagens, a placa foi incubada com IgG de camundongo anti-protease de *A. actinomycescomitans* na concentração de 30 µg/ml a 37°C por 2 horas. Após a incubação e as 4 lavagens da placa, foi adicionado 100 µl do conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo (A-8924, Sigma, St. Louis,

MO, USA ) (1:8000) e incubada por 1 hora e 30 minutos a 37°C. A revelação foi realizada com o orto-feniletlenodiamino diidroclorato (OPD) (Sigma, St. Louis, MO, USA) e paralisada com solução de ácido sulfúrico 4 N. A leitura da placa foi realizada em leitor ELISA Multiskan EX (Uniscience – Labsystems, Helsinki, Finland) a  $\lambda=492$  nm.

#### **6.4.7. ELISA CAPTURA PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENO SOLÚVEL NO PLASMA**

A sensibilização da placa de ELISA foi realizada com a IgG de coelho anti-protease de *A. actinomycetemcomitans* à IgG na concentração de 50  $\mu\text{g/ml}$  diluído em tampão carbonato-bicarbonato (100  $\mu\text{l/orifício}$ ) e incubada a 37°C por 1 hora, seguida de 18 horas a 4°C. Após o bloqueio por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente, foi seguido de 4 lavagens. Posteriormente, a placa foi incubada com amostras de plasma diluídas 1:10 e incubada por 2 horas. Realizadas novas lavagens, a placa foi incubada com IgG de camundongo anti-protease de *A. actinomycetemcomitans* na concentração de 30  $\mu\text{g/ml}$  a 37°C por 2 horas. Após a incubação e as 4 lavagens da placa, foi adicionado 100  $\mu\text{l}$  do conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo (A-8924, Sigma, St. Louis, MO, USA ) (1:8000) e incubada por 1 hora e 30 minutos a 37°C, seguindo a revelação do item anterior.

#### **6.4.8. ANÁLISE DE IgG ANTI-PROTEASE DE *A. actinomycetemcomitans* À IgG NO PLASMA POR ELISA**

A placa de ELISA foi sensibilizada com 100  $\mu\text{l/orifício}$  da fração de protease de *A. actinomycetemcomitans* à IgG (40  $\mu\text{g/ml}$ ) diluído em tampão carbonato-bicarbonato e incubada a 37°C por 1 hora, seguida de 18 horas a 4°C. Após o bloqueio por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente, foi seguido de 4 lavagens. Posteriormente, a placa foi incubada com amostras de plasma (1:50) em triplicata a 37°C por 2 horas. Após a incubação e as 4 lavagens da placa, foi adicionado 100  $\mu\text{l}$  do conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo (A-8924, Sigma, St. Louis, MO, USA ) (1:8000) e incubada por 1 horas e 30 minutos a 37°C, seguindo a revelação do item anterior.

#### **6.4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para análise estatística dos resultados de ELISA entre grupos foi aplicado ANOVA, seguido pelo teste Tukey. Considerando estatisticamente significantes os resultados com valores  $p < 0,05$ .

### **6.5.RESULTADOS**

#### **6.5.1. NÍVEL DE PROTEASE DE *A. actinomycetemcomitans* À IgG EM AMOSTRAS DE GENGIVA PALATAL**

Os resultados obtidos demonstraram nível elevado de protease à IgG em amostras de gengiva palatal de animais infectados em relação aos animais não infectados, sendo a diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle em relação aos grupos 15, 30 e 60 dias pós-infecção e entre o grupo 15 dias em relação aos grupos 30 e 60 dias pós-infecção (Figura 1).

### **6.5.2. NÍVEL DE PROTEASE DE *A. actinomycetemcomitans* À IgG EM AMOSTRAS DE TECIDO CARDÍACO**

Os resultados obtidos demonstraram nível elevado de protease à IgG em amostras de coração de animais infectados em relação aos animais não infectados, sendo a diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle em relação aos grupos 15, 30 e 60 dias pós-infecção e entre o grupo 15 dias em relação ao grupo 60 dias pós-infecção. A diferença foi também estatisticamente significativa entre o grupo 30 dias em relação ao grupo 60 dias pós-infecção (Figura 2).

### **6.5.3. NÍVEL DE PROTEASE DE *A. actinomycetemcomitans* À IgG EM AMOSTRAS DE CÉREBRO**

Os resultados obtidos demonstraram nível elevado de protease à IgG em amostras de cérebro de animais infectados em relação aos animais não infectados, sendo a diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle em relação aos grupos 15, 30 e 60 dias pós-infecção e entre o grupo 15 dias em relação ao grupo 60 dias pós-infecção. A diferença foi também estatisticamente significativa entre o grupo 30 dias em relação ao grupo 60 dias pós-infecção (Figura 3).

### **6.5.4. NÍVEL DE PROTEASE DE *A. actinomycetemcomitans* À IgG NO PLASMA**

Os resultados obtidos demonstraram nível elevado de protease no plasma de animais infectados em relação aos animais não infectados, sendo a diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle em relação aos grupos 15, 30 e 60 dias pós-infecção (Figura 4).

### **6.5.5. NÍVEL DE IgG ANTI-PROTEASE DE *A. actinomycetemcomitans* À IgG NO PLASMA**



Os resultados obtidos demonstraram nível elevado de IgG anti-protease de *A. actinomycetemcomitans* à IgG em amostras de plasma de animais infectados em relação aos animais não infectados, sendo a diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle em relação ao grupo 15, 30 e 60 dias pós infecção e entre os grupos 15 dias e 60 dias pós infecção (Figura 5).

## **6.6. DISCUSSÃO**

As bactérias periodontais podem penetrar nos tecidos através de uma invasão ativa e, tem sido demonstrado que *A. actinomycetemcomitans*

apresenta a capacidade de invadir as células epiteliais orais, *in vitro* (MEYER *et al.*, 1991), podendo espalhar de célula em célula por endocitose (MEYER *et al.*, 1996).

Oshiro (2008), utilizando a metodologia de infecção bucal, desenvolvida por Garlet *et al.*, (2005), demonstrou a disseminação do *A. actinomycetemcomitans* para o tecido cardíaco, isolando o microrganismo do referido tecido. A positividade foi demonstrada nos dias 15, 30 e 60 dias pós-infecção. Utilizando amostras dos mesmos camundongos, no presente trabalho foi demonstrada a presença de protease à IgG de *A. actinomycetemcomitans* tanto no tecido de gengiva palatal como nas amostras de plasma, de coração ou do cérebro, que pode ser resultado tanto da disseminação como da difusão de protease na sua forma solúvel. A presença de atividade de protease no sobrenadante de cultura de *A. actinomycetemcomitans* (NAKANISHI *et al.*, 2006), sugere que esse microrganismo libere naturalmente esse fator. Ainda, *in vivo* a sua liberação pode ser tanto espontânea como decorrente de lise por mecanismos de defesa do hospedeiro.

O nível de protease mais elevado na gengiva palatal na fase inicial da infecção, seguida de decréscimo, poderia ser devido à ação de resposta imune controlando a infecção na fase mais tardia. Todavia, é observado aumento no nível de protease no tecido cardíaco e cerebral na fase mais tardia, o que sugere a migração dos referidos microrganismos da gengiva palatal para outros tecidos. Considerando nível elevado de protease no plasma essa migração possivelmente deve ter ocorrido via hematogênica.

Oshiro (2008) demonstrou ausência de leucotoxina no tecido cerebral enquanto que neste trabalho foi evidenciado aumento significativo de protease no tecido cerebral em todos os períodos analisados. Portanto esses resultados sugerem que a protease e não o microrganismo migrou para o cérebro.

A não difusão da leucotoxina para o cérebro possivelmente seja devido à sua alta massa molecular (MM) de ~150 kDa diferenciando da protease de ~50 kDa (NAKANISHI *et al.*, 2008). Portanto a protease de menor MM poderia apresentar maior facilidade na difusão para o tecido cerebral ou também pode ser devido alguma afinidade tecidual específica.

Os níveis plasmáticos de IgG anti-protease de *A. actinomycetemcomitans* foram significativamente elevados nos animais infectados em relação ao não infectados. Esses resultados estão de acordo com os dados de aumento no nível de anticorpos à leucotoxina em pacientes com periodontites (NAKAGAWA, 2000) e de IgG anti-leucotoxina em modelo experimental em camundongos (OSHIRO, 2008). No entanto, houve decréscimo significativo no nível sérico de IgG anti-protease na fase tardia da infecção. Essa diminuição possivelmente tenha ocorrido em função da ação de protease. Possivelmente a interação de IgG anti-protease levando a formação de complexo Ag-Ac, tenha facilitada a ação da enzima sobre a IgG anti-protease. Todavia, como discutido por OSHIRO (2008), não podemos descartar também a ação imunossupressora de outros fatores de virulência de *A. actinomycetemcomitans*, tais como a leucotoxina que atua tanto na fase de indução da resposta bem como sobre os linfócitos T e toxina Cdt que apresenta ação mais específica sobre os linfócitos T (CELLEN *et al.*, 2006; SHENKER *et al.*, 2006).

Embora em nível menor na fase tardia, a presença de IgG anti-protease no decorrer da infecção poder ser que apresente algum papel protetor, neutralizando a ação da protease, ou ainda esteja envolvida na patogênese, o que requer estudos adicionais.

Os resultados obtidos poderão contribuir tanto para diagnóstico como também para estudos epidemiológicos e para a melhor compreensão da patogênese extra periodontal uma vez que Pussinen *et al.*, (2003) demonstraram também anticorpos séricos contra *A. actinomycetemcomitans* em pacientes com doenças coronárias.

Concluimos pelo trabalho que a infecção bucal de camundongos com *A. actinomycetemcomitans* induz aumento no nível de protease à IgG, tanto localmente como de forma sistêmica e, se esse aumento interfere na diminuição de IgG específica a *A. actinomycetemcomitans* no decorrer da infecção, requer estudos adicionais.

## 6.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AVILA-CAMPOS, M.J.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.R.; DAMASCENO, C.A.V.; CISALPINO, E.O. Atividade hemolítica de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Rev. Microbiol.**, v. 19, p.262-265, 1988.

CELLEN, L.M.; DECOSTERE, A.; DUCATELLE, R. Cytolethal distending toxin generates cell death by inducing a bottleneck in the cell cycle. **Microbiol. Res.**, v. 161, p.109-120, 2006.

CHEN, Y.W.; UMEDA, M.; NAGASAWA, T.; TAKEUCHI, Y.; HUANG, Y.; INOUE Y.; IWAI, T.; IZUMI, Y.; ISHIKAWA, I. Periodontitis may increase the risk of peripheral arterial disease. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, v. XX, p. 1-6, 2007.

GARLET, G.P.; AVILA-CAMPOS, M.J.; MILANEZI, C.M.; FERREIRA, B.R.; SILVA, J.S. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. **Microb. Infect.**, v. 7, p. 738–747, 2005.

GARNER, J.G. Isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus* at Auckland Hospital. **New Zealand Med. J.**, v.89, p.384-386, 1979.

GENCO, R.J.; CHRISTERSSON, L.A.; ZAMBON, J.J. Juvenile periodontitis. **Int. Dent. J.**, v. 36, p. 168-176, 1986.

GERACI, J.E.; WILSON, W.R.; WASHINGTON, J.A. Infective endocarditis caused by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Mayo Clin. Proc.**, v.55, p.415-419, 1980.

GMÜR, R.; McNABB, H.; van- STEENBERGEN, T.J.M.; BAEHNI, P.; MOMBELLI, A.; VAN WINKELHOLFF, A.J.; GUGGENHEIN, B. Seroclassification of hitherto nontypeable *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains: evidence for a new serotype e. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.8, p.116-120, 1993.

GREGORY, R.L.; KIM, D.E.; KINDLE, J. C.; HOBBS, L.C. Immunoglobulin-degrading enzymes in localized juvenile periodontitis. **J. Periodont. Res.**, v.27, p.176-183, 1992.

HARASZTHY, V.I.; ZAMBIN, J.J.; TREVISAN, M.; ZEID, M.; GENCO, R.J. Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and others forms of early-onset periodontitis. **J Periodontol**, v. 71, p. 912-922, 2000.

KAPLAN, J.B.; PERRY M.B.; MACLEAN, L.L.; FURGANG, D.; WILSON, M.E.; FINE, D.H. Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 5375-5384, 2001.

KUBY, J. **Immunology**. 3<sup>th</sup>. New York, U.S.A.: W.H. Freeman, 2000.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MEYER, D.H.; LIPPMANN, J.E.; FIVES-TAYLOR, P.M. Invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* a dynamic multistep process. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2988-2997, 1996.

MEYER, D.H.; SREENIVASAN, P.K.; FIVES-TAYLOR, P.M. Evidence for invasion of a oral cell line by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 2719-2726, 1991.

NAKAGAWA, R.I. **Atividade leucotóxica de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sobre a linhagem celular P3U1 e anticorpos anti-fração de leucotoxina em soros de pacientes com periodontite juvenil localizada.** Londrina, 2000. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

NAKANISHI, F.A. **Atividade proteolítica de isolados de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* à imunoglobulina G.** Londrina, 2004. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

NAKANISHI, F.A.; AVILA-CAMPOS, M.J.; KAMIJI, N.H.; ITANO, E.N. Immunoglobulin G proteolytic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Braz. J. Microbiol.**, v. 37, p. 42-46, 2006.

NAKANISHI, F.A.; OSHIRO, K.K.; CARNIO, J.G.P.; KAMINAMI, M.S.; KAMIJI, N.H.; ITANO, E.N. Produção e utilização de anticorpos policlonais para análise de protease à IgG em isolados clínicos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e de nível salivar de IgG específica. 2008 (a ser submetido).

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

OSHIRO, K.K. **Infecção bucal e detecção de leucotoxina de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em camundongos.** Londrina, 2008. Dissertação do Programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Londrina.

PATUREL, L.; CASALTA, J.P.; HABIB, G.; NEZRI, M.; RAOULT, D. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* endocarditis. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 10, p. 98-118, 2004.

PUSSINEN, P.J.; JOUSILAHTI, P.; ALFTHAN, G.; PALOSUO T.; ASIKAINEN, S.; SALOMAA, V. Antibodies to periodontal pathogens are associated with coronary heart disease. **Arterioscler Thromb Vasc. Biol.**, v. 23, p. 1250-1254, 2003.

SAARELA, M.; ASIKAINEN, S.; ALALUUSUA, S.; PYHALA, L.; LAI, C.H.; JOUSIMIES-SOMER, H. Frequency and stability of mono-or poly-infection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, b, c, d or e. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 7, p. 277-279, 1992.

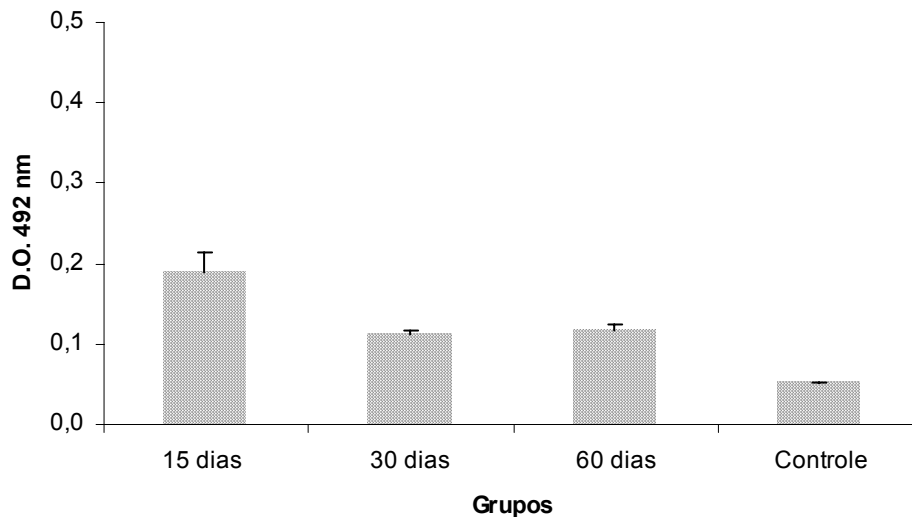
SHENKER, B.J.; DEMUTH, D.R.; ZEKAVAT, A. Exposure of lymphocytes to high doses of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin induces rapid onset of apoptosis-mediated DNA fragmentation. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 2080-2092, 2006.

SLOTS, J.; GENCO, R. Microbial pathogenecity. Black-pigmented *Bacteoides* species, *Capnocytophaga* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Virulence factors, colonization, survival and tissue destruction. **J. Dent. Res.**, v.63, p.412-421, 1984.

SOCRANKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease – Current concepts. **J. Periodontol.**, v. 63, p. 322-331, 1992.

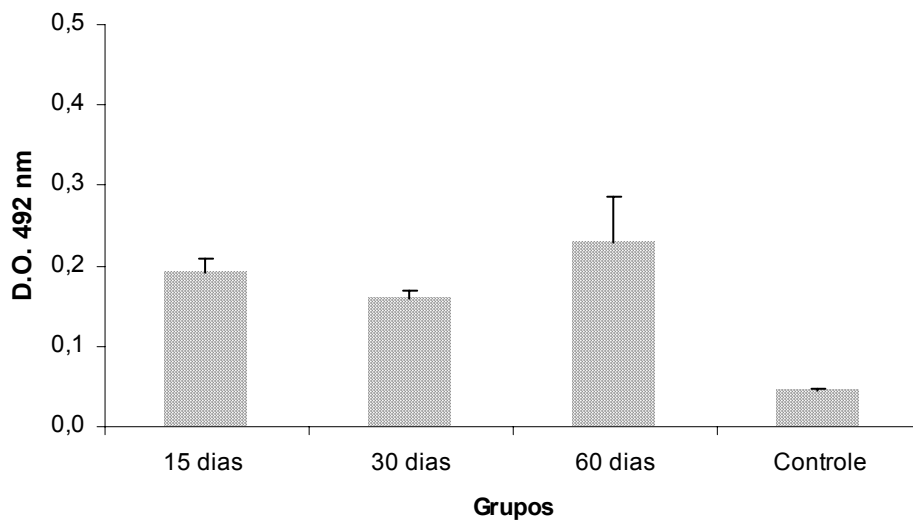
ZAMBON, J.J.; CHRITERSSON, L.A.; SLOTS, J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. **J. Periodontol.**, v. 54, p. 707-711, 1983.

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



**Figura 1. Nível de protease de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 à IgG em amostras de gengiva palatal.** Placas de ELISA foram sensibilizadas com IgG de coelho anti-protease e incubadas com amostras de gengiva palatal provenientes de camundongos infectados oralmente com *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 (período de 15, 30 e 60 dias pós infecção) e camundongos não infectados (Controle), em triplicata. Posteriormente, foi adicionada IgG de camundongo anti-protease de *A. actinomycetemcomitans*. Os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O.) a  $\lambda=492\text{nm}$ , considerando  $p<0,05$  estatisticamente significante.  
15 dias, 30 dias, 60dias x Controle =  $p<0,05$   
15 dias x 30 dias, 60dias =  $p<0,05$



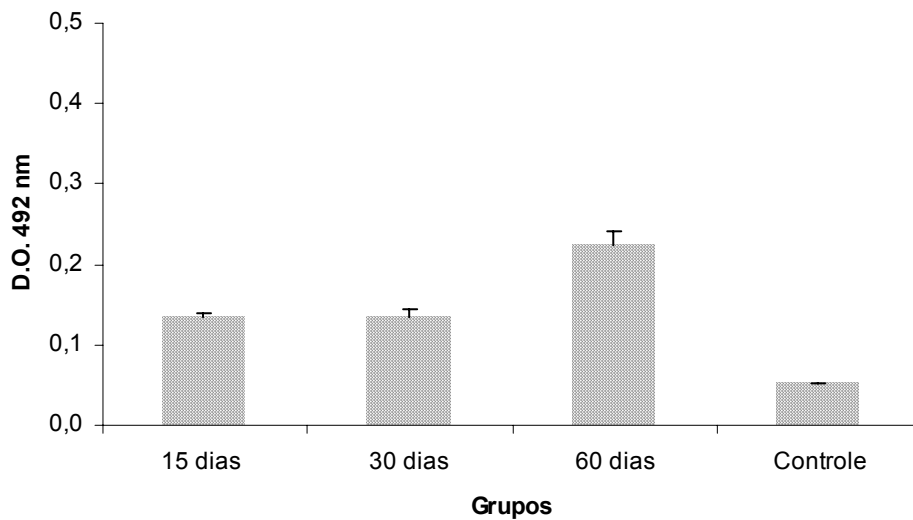


**Figura 2. Nível de protease de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 à IgG em amostras de coração.** Placas de ELISA foram sensibilizadas com IgG de coelho anti-protease e incubadas com amostras de coração provenientes de camundongos infectados oralmente com *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 (período de 15, 30 e 60 dias pós infecção) e camundongos não infectados (Controle), em triplicata. Posteriormente, foi adicionada IgG de camundongo anti-protease de *A. actinomycetemcomitans*. Os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O.) a  $\lambda=492\text{nm}$ , considerando  $p<0,05$  estatisticamente significante.

15 dias, 30 dias, 60dias x Controle =  $p<0,05$

15 dias x 60 dias =  $p<0,05$

30 dias x 60dias =  $p<0,05$

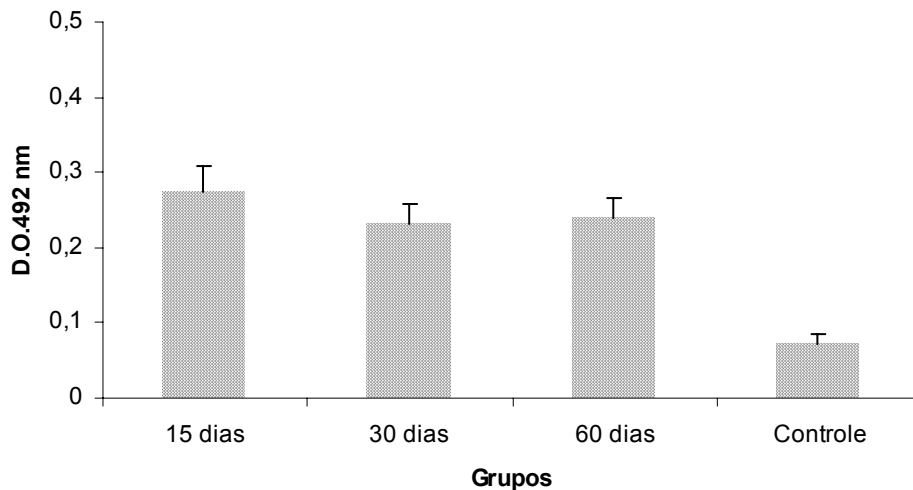


**Figura 3. Nível de protease de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 à IgG em amostras de cérebro.** Placas de ELISA foram sensibilizadas com IgG de coelho anti-protease e incubadas com amostras de cérebro provenientes de camundongos infectados oralmente com *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 (período de 15, 30 e 60 dias pós infecção) e camundongos não infectados (Controle), em triplicata. Posteriormente, foi adicionada IgG de camundongo anti-protease de *A. actinomycetemcomitans*. Os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O.) a  $\lambda=492\text{nm}$ , considerando  $p<0,05$  estatisticamente significante.

15 dias, 30 dias, 60dias x Controle =  $p<0,05$

15 dias x 60 dias =  $p<0,05$

30 dias x 60dias =  $p<0,05$



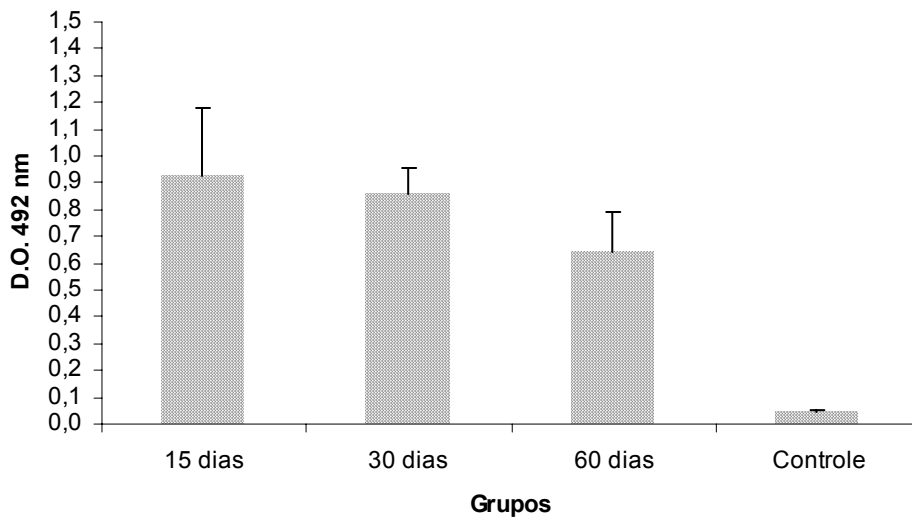
**Figura 4. Nível de protease *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 à IgG no plasma.** Placas de ELISA foram sensibilizadas com IgG de coelho anti-protease e incubadas com plasmas provenientes de camundongos infectados oralmente com *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 (período de 15, 30 e 60 dias pós infecção) e camundongos não infectados (Controle), em triplicata. Posteriormente, foi adicionada IgG de camundongo anti-protease de *A. actinomycetemcomitans*. Os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O.) a  $\lambda=492\text{nm}$ , considerando  $p<0,05$  estatisticamente significante.

15 dias, 30 dias, 60dias x Controle =  $p<0,05$

15 dias x 30 dias =  $p>0,05$

15 dias x 60 dias =  $p>0,05$

30 dias x 60dias =  $p>0,05$



**Figura 5. Nível de IgG anti-protease de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 à IgG nos plasmas.** Placas de ELISA foram sensibilizadas com frações de protease à IgG e incubadas com amostras de plasmas de camundongos infectados oralmente com *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 (período de 15, 30 e 60 dias pós infecção) e camundongos não infectados (Controle) em triplicata. Os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O.) a  $\lambda=492\text{nm}$ , considerando  $p<0,05$  estatisticamente significante.

15 dias, 30 dias, 60dias x Controle =  $p<0,05$

15dias x 60 dias =  $p<0,05$

## 7. CONCLUSÕES

- A protease possivelmente apresenta MM ~ 50 kDa baseada em evidência indireta pelo reconhecimento de anticorpos policlonais anti-protease de *A. actinomycetemcomitans*.
- É possível utilizar ELISA captura para determinação de concentração de protease em isolados clínicos de *A. actinomycetemcomitans* ou em amostras de sangue ou de tecidos de camundongos infectados oralmente.
- A concentração de protease liberada pelos isolados de *A. actinomycetemcomitans* provenientes de pacientes com PAL é similar aos provenientes de PUN/SIDA.
- O nível de IgG salivar anti-protease encontra-se elevado em pacientes com PAL em relação aos indivíduos saudáveis.
- Níveis de anticorpos específicos presentes em salivas de pacientes com PAL podem sofrer decréscimo pela atuação de sobrenadante de cultivo do *A. actinomycetemcomitans*, sugerindo potencial desse microrganismo em alterar título de anticorpos na saliva.
- A infecção bucal de camundongos com *A. actinomycetemcomitans* induz aumento no nível de protease à IgG localmente e em tecido cardíaco ou cerebral.
- A infecção bucal de camundongos com *A. actinomycetemcomitans* induz aumento no nível de protease circulante, o que potencializa a utilização da amostra para diagnóstico ou acompanhamento de infecção.

- Ocorre variação nos níveis de protease local de forma distinta de tecido cardíaco e cerebral no decorrer da infecção bucal de camundongos com *A. actinomycetemcomitans*.
- A infecção bucal de camundongos com *A. actinomycetemcomitans* induz aumento no nível de IgG anti-protease circulante mais evidente na fase inicial que tardia da infecção.

## 8. Anexo

### Microbiology

**Immunoglobulin G Proteolytic Activity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Isolated from Periodontitis Patients**

**Atividade Proteolítica de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Isolados de Pacientes com Periodontites à Imunoglobulina G Humana**

Fernanda Akemi Nakanishi<sup>\*</sup>

Mario Julio Avila-Campos<sup>\*\*</sup>

Mirian Marubayashi Hidalgo<sup>\*\*\*</sup>

Emília Teruko Kobayashi<sup>\*\*\*\*</sup>

Eiko Nakagawa Itano<sup>\*\*\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Fellow, Coordination of Higher-Level Professional Improvement Program (CAPES)

<sup>\*\*</sup>Doctor, Department of Microbiology, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

\*\*\* Doctor, Department of Dentistry, State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil.

\*\*\*\* Doctor, Universtity Center of Maringá, Maringá, PR, Brazil.

\*\*\*\*\* Doctor, Department of Pathology Science, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil.

## **ABSTRACT**

The protease to immunoglobulin G of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is an important evasion mechanism showed by this microorganism. In this study, the proteolytic activity of *A. actinomycetemcomitans* strains (9 isolated from localized aggressive periodontitis, 22 from AIDS-necrotizing ulcerative periodontitis, and reference strain ATCC 43718) on human immunoglobulin G was analysed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). AIDS-necrotizing ulcerative periodontitis isolates were significant more active than isolates from localized aggressive periodontitis. Moreover, a high heterogeneity was observed among both analyzed groups. In conclusion, *A. actinomycetemcomitans* strains display heterogeneous protease activity that is higher in AIDS-necrotizing ulcerative periodontitis than localized aggressive periodontitis.

**DESCRIPTORS:** Immunoglobulin G, Periodontitis, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Protease, AIDS.



## **RESUMO**

A protease de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* à imunoglobulina G é um importante mecanismo de escape desse microrganismo. No presente trabalho, a atividade proteolítica de cepas de *A. actinomycetemcomitans* (9 isoladas de periodontite agressiva localizada, 22 de periodontite ulcerativa necrotizante-AIDS e a cepa de referência ATCC 43718) sobre imunoglobulina G foi analisada por ensaio imunoenzimático (ELISA). Isolados de periodontite ulcerativa necrotizante-AIDS teve atividade mais significativa do que os isolados de periodontite agressiva localizada. Porém, uma alta atividade foi observada entre ambos os grupos analisados. Concluimos que cepas de *A. actinomycetemcomitans* exibem atividade proteolítica heterogênea e que é maior em periodontites ulcerativa necrotizante-AIDS do que em periodontites agressiva localizada.

**DESCRITORES:** Imunoglobulina G, Periodontites, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Protease, AIDS.

## INTRODUCTION

Periodontal disease harbor several clinical entities including gingivitis and periodontitis producing loss bone<sup>10</sup>. The localized aggressive periodontitis (LAP) is characterized by rapid and marked bone loss around incisive and molar tooth and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*<sup>11</sup>, which was named *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, is frequently associated<sup>1,6,12,18</sup>. This organism have been also associated to HIV-positive patients with periodontal disease<sup>7,13,21</sup>. *A. actinomycetemcomitans* is a gram-negative cocobacillus, capnophylic, non-motile and produces catalase<sup>22</sup>. It was grouped into ten biotypes according the dextrin, galactose, maltose, mannitol, and xilose fermentation<sup>16</sup>, and into five serogroups<sup>23</sup>.

*A. actinomycetemcomitans* is able to produce several virulence factors which collaborate against host response, such as leukotoxin<sup>4,19</sup> and protease<sup>3</sup>. Little is known about protease from *A. actinomycetemcomitans*. Gazi et al.<sup>2</sup> showed it is alanine-lisine specific and Wang et al.<sup>20</sup> finding a 50kDa serine or metalloprotease to collagen type I and fibronectin. Moreover, Gregory et al.<sup>3</sup> showed *A. actinomycetemcomitans*, producing enzymes able to cleave to IgG, IgA and IgM and also an extensive degradation of IgG and IgA by crevice fluid from aggressive periodontitis patients compared with healthy subjects.

Studies have shown that *A. actinomycetemcomitans*-positive periodontal patients produce an increased salivary IgG<sup>15</sup> or a low production of IgG in periodontal patients<sup>5,8</sup>, suggesting that protease production in those organisms is heterogeneous. In this study, the protease activity of *A.*

*actinomycetemcomitans* isolated from aggressive periodontitis and from necrotizing ulcerative periodontitis against human IgG was evaluated.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **1. Specimens and microorganisms**

*A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 serotype b and isolates from localized aggressive periodontitis (LAP) (P9, P15, P23, P24, P28, P35, P36, P37, P45) and from AIDS-necrotizing ulcerative periodontitis (AIDS/NUP) patients (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A10, A11, A12, A13, A14, A15, A16, A17, A18, A19, A20, A21, A22, A23) were grown 72h on brain heart infusion (BHI) supplemented with 0.5% yeast extract (Biobrás, Montes Claros, MG, Brazil) under microaerofilia conditions, at 37°C. Then, organisms were harvested by centrifugation (Hitachi himac CR21, Japan) (10.000 x g, 20min, 4°C) and the supernatant protein concentrations were determined using the Folin phenol method and bovine serum albumin as standard. All samples were adjusted to the same protein concentration (880µg/mL), and 1.0mL aliquots were stored at -80°C until use.

### **2. Human IgG purification**

Human IgG was purified from serum in a Sepharose-protein G column (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). The IgG was eluted with 0.1M glycine-HCl, pH2.8, and immediately neutralized with 2M Tris, pH9.0. Fractions (1.0mL) were collected and read in a spectrophotometer at 280nm. The fractions with the highest absorbency were mixed. The resulting pool

was dialysed against 0.15M phosphate-buffered saline (PBS), and the protein concentration was determined using the Folin phenol method.

### **3. IgG proteolytic activity of isolated *A. actinomycetemcomitans* and ATCC 43718**

The IgG proteolytic activity of isolated *A. actinomycetemcomitans* and ATCC 43718 supernatants was performed according Gregory et al.<sup>3</sup>, with some modifications. Purified human IgG (250ng well<sup>-1</sup>) was diluted in 0.1M carbonate buffer, pH9.6, and 96-well flat polystyrene plates were sensitized and incubated for 1h at 37°C and overnight at 4°C. The plates were washed 5 times with PBS-0.05% Tween 20 (PBS-T), blocked with PBS-T-5% skim milk (PBS-T-M) for 2h at 37°C, and then incubated with isolated *A. actinomycetemcomitans* and ATCC 43718 supernatants (72h culture) at dilution 1/32 in a period of 24h of incubations. The BHI medium was used as control. The plates were washed with PBS-T (5x) and incubated with anti-human IgG peroxidase-labeled diluted 1:4000 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), washed 5 times, and a substrate solution (5mg orthophenylenediamine - Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, 10mL of 0.1M citrate buffer, pH4.5 and 5µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (100µL well<sup>-1</sup>) was added. The reaction was halted with 50µL of 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and absorbency was read in a Titertek Multiskan EIA reader (Labsystems, Helsinki, Finland) at 492 nm. The protease activity was determined in percentage of degradation, considering 100% non-degradation with BHI medium.

### **4. Statistical analysis**

Data were analyzed statistically by using ANOVA F and Tukey's Test (variance analysis) and considered significant if the P value was lower than 0.05 (p<0.05).

## **RESULTS**

### **1. IgG proteolytic activity of isolated *A. actinomycetemcomitans***

The result of IgG proteolytic activity in % by group of *A. actinomycetemcomitans* isolated from AIDS/NUP (23.10%  $\pm$  1.24) and from LAP (16.21%  $\pm$  1.22) patients was statistically different ( $p < 0.05$ ). The analysis of each isolated supernatant showed heterogeneous IgG proteolytic activity and only one isolated (A4) showed statistically the same % of activity of the reference strain ( $\alpha = 0.05$ ) (Table 1).

## DISCUSSION

Gregory et al.<sup>3</sup> showed proteolytic enzymes in supernatant of cultures of *A. actinomycetemcomitans*, able to cleave in vitro to IgG. Also, it was observed a severe degradation of IgG from crevice gingival samples in localized aggressive periodontitis patients.

In this study was observed human IgG degradation by isolated *A. actinomycetemcomitans* and ATCC 43718. In our previous study, the greatest protease activity was observed in 72h culture, suggesting that growth medium or growth period can influence in activity<sup>9</sup>.

Salivary immunoglobulin plays an important role in oral cavity protecting against microbial colonization or invasion<sup>14</sup>. Studies have often shown association between *A. actinomycetemcomitans* and aggressive periodontitis but rarely the increasement of IgG in saliva<sup>5,8</sup>. It is explain that the level of immunoglobulin present in saliva might be associated with leukotoxin or suppressive factors produced by *A. actinomycetemcomitans*, or maybe for cross reaction among oral microbiota, including non-leukotoxic strains<sup>5</sup>. However, an increase of IgG in serum but not in saliva has been

observed in patients with localized aggressive periodontitis<sup>8</sup>, and it suggests the induction of immune response for *A. actinomycetemcomitans*.

Because different *A. actinomycetemcomitans* strains may produce various hosts' responses, in this work, the proteolytic activity of this organism was evaluated, and significant differences were observed among tested isolates. This heterogeneous activity could explain the contradictory salivary IgG levels in a literature<sup>5,8,15</sup>. Besides an increase specific IgG salivary showed by Sandholm et al.<sup>15</sup> not all patients showed increased IgG levels (55%) to *A. actinomycetemcomitans*.

The activity was higher in *A. actinomycetemcomitans* strains isolated from AIDS/NUP. In a HIV- infection specific anti-periodontopathogenic IgG responses are depressed<sup>17</sup> and our results suggest that the local IgG level could be also decreased by protease activity of some *A. actinomycetemcomitans* strains.

## **CONCLUSION**

*A. actinomycetemcomitans* strains display heterogeneous IgG protease activity and higher activity is observed in AIDS-NUP than LAP isolates. This heterogeneous activity could explain the discordant data about salivary IgG levels in periodontitis patients, that require further study.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank Mári Sumigawa Kaminami and Nilson de Jesus Carlos for their technical assistance, Édio Vizoni for statistical analysis and PROPPG/UEL, FINEP, SETI/PR, Fundação Araucária and CAPES for financial support.

## REFERENCES

1. Asikainen S, Jousimies-Somer H, Kanervo A, Summanen P. Certain bacterial species and morphotypes in localized juvenile periodontitis and in matched controls. *J Periodontol* 1987; 58 (4): 224-230.
2. Gazi MI, Cox SW, Clark DT, Eley BM. Characterization of protease activities in *Capnocytophaga* spp, *Treponema denticola* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol* 1997; 12(4): 240-248.
3. Gregory RL, Kim DE, Kindle JC, Hobbs LC. Immunoglobulin- degrading enzymes in localized juvenile periodontitis. *J Periodont Res* 1992; 27(3): 176-183.

4. Guazeli-Amin VH, Avila-Campos MJ, Barbosa DS, Gaetti-Jardim E, Trevisan Jr W, Itano EN. Leukotoxic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from brazilian periodontal patients. *Anae* 2000; 6(6): 341-346.
5. Hidalgo MMH, Itano EN, Nakagawa RI, Trevisan Jr W, Avila-Campos MJ. Doença periodontal: Estudo da resposta imune humoral. *Rev Odontol Univ São Paulo*. 1998; 12(3): 207-213.
6. Lang N, Bartold PM, Cullian M, Jeffcoat M, Mombelli A, Murakami S, Page R, Papapanou P, Tonetti M, Van Dyke, T. Consensus report: Aggressive Periodontitis. *Ann Periodontol* 1999; 4(1): 53.
7. Murray PA., Grassi M, Winkler JR. The microbiology of HIV- associated periodontal lesions. *J Clin Periodontol* 1989; 16(10): 636-642.
8. Nakagawa RI, Guazeli-Amin VH, Hidalgo MM, Trevisan Jr W, Itano EN. Anticorpos anti-leucotoxina contra *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em amostras de soro e saliva de pacientes com periodontite juvenil localizada. *Pesq Odontol Bras* 2001; 15(1): 5-11.
9. Nakanishi FA, Avila-Campos MJ, Itano EN. Immunoglobulin G proteolytic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Braz J Microbiol* 2006, 37: 42-46.
10. Nisengard RJ, Newman M.G. Zambon JJ. (1994) Periodontal disease. In: Nisengard R.J. & Newman M.G. *Oral Microbiol Immunol* p.360-284 Philadelphia P.A. W.B. Saunders.
11. Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and



V factor-independent isolates. Int J System Evol Microbiol 2006, 56(9): 2135-2146.

12. Page RC, Vandesteen GE, Ebersole JL, Willians BL, Dixon IL, Altman LC. Clinical and laboratory studies of a family with a high prevalence of juvenile periodontitis. J Periodontol 1985; 56(10): 602-609.

13. Rams TE, Andriolo M, Feik D, Abel SN, McGivern TM, Slots J. Microbiol study of HIV- related periodontitis. J Periodontol 1991; 62(1): 74-81.

14. Roitt IM, Brostoff J, Male DK. Immunology. 5<sup>th</sup>. Great Britain: Mosby; 2000.

15. Sandholm L, Tolo K, Olsen I. Salivary IgG, a parameter of periodontal disease activity? J Clin Periodontol 1987; 14(5): 289-294.

16. Slots J, Reynolds HS, Genco, RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. Infect Immun 1980; 29(3): 1013-1020.

17. Steinsvoll S, Myint M, Odden K, Berild D, Schenck K. Reduced serum IgG reactivities with bacteria from dental plaque in HIV-infected persons with periodontitis. J Clin Periodontol 1997; 24(11): 823-829.

18. Takahashi K, Nagai A, Satoh N, Kurihara H, Murayama Y. Studies on phenotypic and functional characterization of peripheral blood lymphocytes from patients with early-onset periodontitis. J Periodontol 1995; 66(5): 391-396.

19. Tsai C-C, Shenker BJ, DiRienzo JM, Malamud D, Taichman NS. Extraction and isolation of a leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* with polymixin B. Infect Immun 1984; 43(2): 700-705.

20. Wang PL., Shirasu S, Shinohara M, Daito M, Fujii T, Kowashi Y, Ohura K. Purification and characterization of a trypsin- like protease from the culture supernatant of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4. Eur J Oral Sci 1999; 107(2): 147-153.
21. Zambon JJ, Reynolds HS, Genco RJ. Studies of the subgingival microflora in patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. J Periodontol 1990; 61(11): 699-704.
22. Zambon J.J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J Clin Periodontol 1985; 12(1): 1-20.
23. Zambon JJ., Slots, J, Miyasaki K, Linzer R, Cohen R, Levine M, Genco, RL. Purification and characterization of the serotype c antigen from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infect Immun 1983; 44(1): 22-27.

**Table 1. IgG proteolytic activity of isolated *A. actinomycetemcomitans***

The result of IgG proteolytic activity by ELISA in group of *A. actinomycetemcomitans* isolated from LAP and AIDS/NUP patients. Results of the mean value of three trials in triplicate of human IgG incubated with 1/32 diluted supernatant of 72 h culture during 24 h and then incubated with anti-human IgG peroxidase and the absorbency read at 492 nm. The results of IgG proteolytic activity were determined in percentage of degradation, considering 100% non-degradation with BHI medium.

Samples source	Samples	% of IgG degradation	$\alpha=0.05$
Reference	ATCC 43718	54.12 ± 2.49	a
LAP patients	P37	30.88 ± 2.79	b
	P36	21.05 ± 0.41	c
	P24	20.29 ± 1.44	cd
	P15	19.37 ± 0.17	cde
	P23	18.34 ± 1.97	cdf
	P35	11.39 ± 0.00	eg
	P28	10.66 ± 0.62	h
	P9	9.27 ± 2.57	hi
	P45	4.67 ± 1.03	hij
	<u>Mean</u>	16.21 ± 1.22	
AIDS/NUP patients	A4	51.76 ± 1.55 (*)	a
	A8	41.16 ± 0.51	l
	A15	39.23 ± 0.86	lm
	A16	33.17 ± 1.33	bm n
	A23	30.51 ± 0.86	bno
	A22	28.69 ± 0.17	bnop
	A1	28.40 ± 0.30	bnopq
	A2	25.18 ± 1.37	bcdopqr
	A20	24.40 ± 2.14	cdefopqrs
	A21	21.75 ± 1.65	cdefrst
	A11	21.07 ± 0.69	cdefrstu
	A6	20.08 ± 0.52	cdefrstuv
	A7	19.80 ± 1.11	cdefrstuvw
	A3	19.55 ± 1.97	cdefrstuwxy
	A13	18.28 ± 1.03	cdefstuvwxyx
	A5	16.10 ± 0.68	cdefghstuvwxyz
	A10	15.07 ± 1.80	cdefghstuvwxyxa <sup>1</sup>
	A18	14.23 ± 2.48	defghstuvwxyza <sup>1</sup> b <sup>1</sup>
	A12	13.76 ± 1.32	efghstuvwxyzab <sup>1</sup> c <sup>1</sup>
	A17	11.33 ± 1.28	ghstuvwxyzabcd <sup>1</sup>
A19	8.36 ± 2.57	ghstuvwxyzabcde <sup>1</sup>	
A14	6.42 ± 0.52	ghstuvwxyzabcde <sup>1</sup>	
<u>Mean</u>	23.10 ± 1.24		
Control/ Papain		90.0 ± 3.52	



# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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