

**ALINE MIRANDA SCOVINO**

**INFLAMAÇÃO GENGIVAL CAUSADA PELA BACTÉRIA *PORPHYROMONAS GINGIVALIS*: O PAPEL DO RECEPTOR TLR2 E DO SISTEMA CININAS NOS MECANISMOS DE INDUÇÃO DE IMUNIDADE ADAPTATIVA**



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica)

**ORIENTADOR: JULIO SCHARFSTEIN**

**RIO DE JANEIRO**

**2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

SCOVINO, Aline Miranda

Inflamação gengival causada pela bactéria *Porphyromonas gingivalis*: O papel do receptor TLR2 e do sistema cininas nos mecanismos de indução de imunidade adaptativa/Aline Miranda Scovino, Rio de Janeiro, 2009.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2009.

Orientador: Julio Scharfstein

Co-orientadora: Luciana Barros de Arruda

1. *Porphyromonas gingivalis*. 2. bradicinina. 3. TLR2.

- I. Scharfstein, Julio (Orientador).
- II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.
- III. Inflamação gengival causada pela bactéria *Porphyromonas gingivalis*: O papel do receptor TLR2 e do sistema cininas nos mecanismos de indução de imunidade adaptativa

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Julio Scharfstein, meu orientador, pela paciência, orientação, apoio, amizade e confiança;

A Profa. Luciana Arruda, minha co-orientadora, pelos anos de aprendizado durante minha iniciação científica;

A Dr. Ana Carolina Monteiro, pela orientação e confiança e principalmente pela amizade e carinho;

Ao Prof. Erik Svenjo, pelas microscopias intravitais;

A Profa. Ana Paula Colombo, pela ajuda no crescimento da bactéria;

Ao Prof. Eduardo Feres-Filho - Faculdade de Odontologia, HU - pela ajuda no entendimento da doença periodontal;

Ao Dr. Jan Potempa - University of Louisville School/ Jagiellonian University – pela colaboração, nos cedendo as bactérias deficientes em gingipaínas R e as moléculas bacterianas, LPS, fimbria e gingipaína;

Ao Dr. Thomas Renné - University of Würzburg – pela colaboração nos cedendo o inibidor do FXII;

Aos amigos de laboratório, Alda F. Alves; Ana Cristina Davales; Daniela Faustino; Daniele Andrade; Cátia Cruz; Juliana Correa; Larissa Almeida; Leila Faustino; Leticia Alves; Rafaela Serra; Vanessa Cruz, pela ajuda e pelos momentos de descontração;

Aos meus amigos, pelo amor, força e apoio em todas as horas;

A minha família que é a grande responsável por ter chegado até aqui e a quem dedico esta dissertação;

Aos professores Claudio de Azevedo Canetti, Maria Bellio, Thereza Christina Barja Fidalgo, Fernando Costa e Silva, Alexandre Morrot e Christianne Bandeira de Melo, por terem aceitado meu convite para serem membros da minha banca de defesa de dissertação;

Ao CNPq, CAPES e a FAPERJ, pelo auxílio financeiro.

## Resumo

*Porphyromonas gingivalis*, uma das bactérias gram negativas responsáveis pela periodontite, é capaz de ativar a via de cininas pela ação da protease gingipaína. Usando um modelo de infecção intrabucal baseada na inoculação com *P. gingivalis*, nós estudamos se a liberação de cininas pela gingipaína pode fazer a ponte entre a inflamação de mucosa e a imunidade de células T, via ativação do receptor de bradicinina B<sub>2</sub>. Nossos dados mostram que *P. gingivalis* W83, mas não a linhagem mutante para gingipaína, Δ Rgps, ou a bactéria selvagem pré-tratada com inibidores da gingipaína, promovem edema bucal e gengivite em animais Balb/C ou C57BL/6. Estudos em animais TLR2<sup>-/-</sup>, B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> e C57BL/6 depletados de PMN (polimorfo nucleares) revelaram que *P. gingivalis* induz edema pela ativação seqüencial de TLR2 e neutrófilos, com o extravasamento de plasma inicial sendo amplificado pela liberação via gingipaína de cininas vasoativas. Nós usamos o antígeno bacteriano fimbria (Fim) para verificar se a ativação do eixo TLR2>PMN>B<sub>2</sub>R, nos tempos iniciais da infecção de mucosa, possui impacto na resposta imune adaptativa. Análises das respostas de células T fimbria-específicas indicam que a gingipaína dirige a geração, dependente de B<sub>2</sub>R, de células T produtoras de IFN-γ nos linfonodos submandibulares de animais Balb\C e C57CL\6 enquanto as células T produtoras de IL-17 foram geradas somente em animais Balb\C. Nossos estudos sugerem que dois fatores de virulência, LPS (um ligante atípico de TLR2) e gingipaína, promovem um *cross-talk* trans-celular entre TLR2\B<sub>2</sub>R, formando um eixo inato que guia o desenvolvimento de células T fimbria-específicas em camundongos desafiados intrabucalmente pela *P. gingivalis*. Outros estudos, já iniciados, poderão esclarecer se a modulação da resposta de células T dirigida pelas cininas pode influenciar também na severidade da doença periodontal crônica.

## Abstract

*Porphyromonas gingivalis*, a gram-negative bacterium that causes periodontitis, activates the kinin system via the cysteine protease R-gingipain. Using a model of buccal infection based on *P. gingivalis* inoculation in the anterior mandibular vestibule, here we studied whether kinins released by gingipain may link mucosal inflammation to T cell-dependent immunity through the activation of bradykinin B<sub>2</sub> receptors (B<sub>2</sub>R). Our data show that *P. gingivalis* W83, but not gingipain deficient mutant or WT bacteria pretreated with gingipain inhibitors, elicited buccal edema and gingivitis in Balb/C or C57BL/6 mice. Studies in TLR2<sup>-/-</sup>, B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> and neutrophil-depleted C57BL/6 mice revealed that *P. gingivalis* induced edema through the sequential activation of TLR2 and neutrophils, with the initial plasma leakage being amplified by gingipain-dependent release of vasoactive kinins from plasma-borne kininogens. We then used fimbriae (Fim)Ag as a stimulus to verify if activation of the TLR2>PMN>B<sub>2</sub>R axis at early-stages of mucosal infection had impact on adaptive immunity. Analyzes of T cell recall responses indicated that gingipain drives B<sub>2</sub>R-dependent generation of IFN- $\gamma$  producing T cells in submandibular LNs of Balb/C and C57BL/6 mice while IL-17 producing T cells were generated only in Balb/C mice. Our studies suggest that two virulence factors, LPS (an atypical TLR2 ligand) and gingipain, forges a trans-cellular cross-talk between TLR2/B<sub>2</sub>R, thus forming an innate axis that guides the development of Fim-specific T cells in mice challenged intrabuccally by *P. gingivalis*. Ongoing research may clarify if kinin-driven modulation of T cell responses may also influence the severity of chronic periodontitis.

## Lista de figuras

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Figura 1	Mecanismo de escape via receptor CR3	17
Figura 2	Mecanismo de escape via heterodimerização de TLR2 e CXCR4.	17
Figura 3	Processo de osteoclastogênese	24
Figura 4	Sistema Cininas – Estrutura e agonistas dos receptores B <sub>2</sub> e B <sub>1</sub> .	28
Figura 5	Sistema de Contato.	30
Figura 6	Importância do eixo inflamatório gingipaína/cinina/B <sub>2</sub> R para a montagem da resposta adaptativa T fimbria-específica do tipo Th1/Th17.	41
Figura 7	A ativação do eixo TLR2/B <sub>2</sub> R é essencial para montagem da resposta imunológica de células T fimbria-específicas em animais infectados intrabucalmente com <i>P. gingivalis</i> .	44
Figura 8	LPS e gingipaína purificados reproduzem o fenótipo inflamatório da bactéria <i>P. gingivalis</i> , induzindo a produção de IL-17 e IFN- $\gamma$ de forma dependente do eixo cininas/B <sub>2</sub> R.	46
Figura 9	Depleção de PMN resulta na incapacidade dos linfócitos T fimbria-específica de animais infectados por <i>P. gingivalis</i> de montar uma resposta tipo Th1/Th17.	50
Figura 10	Análise por microscopia intravital do efeito da repertaxina (antagonista do CXCR2) no extravasamento de plasma induzido pela <i>P. gingivalis</i> .	51
Figura 11	O Perfil funcional de linfócitos T fimbria-específicos isolados do linfonodo submandibular de camundongos Balb/C após re-injecção com 10 <sup>7</sup> <i>P. gingivalis</i> .	53
Figura 12	Ativação do sistema de contato é essencial para que haja resposta edematogênica.	56
Figura 13	Ativação do sistema de contato é essencial para a montagem da resposta anti-Fim Th1 e Th17.	57
Figura 14	A ativação do eixo TLR2/B <sub>2</sub> R direciona a produção de bradicinina nos tecidos extravasculares de mucosa.	67

## Abreviaturas

B<sub>1</sub>R – *B<sub>1</sub> receptor*, receptor B<sub>1</sub> de bradicinina

B<sub>2</sub>R – *B<sub>2</sub> receptor*, receptor B<sub>2</sub> de bradicinina

BHI – *brain heart infusion*, infusão de cérebro e coração

BK – *bradykinin*, bradicinina

CR3 – *complement receptor 3*, receptor de complemento 3

CXCR4 – *CXC chemokine Receptor 4*, receptor de quimiocinas CXCR4

ECA – Enzima conversora de angiotensina

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*,

FimA – fimbria

FT – fator tecidual

FXII – fator XII

HK – *high kininogen*, cininogênio de alto peso molecular

HRgpA – gingipaína R de 95 kDa

IFN- $\gamma$  – Interferon gama

IgG – imunoglobulina G

IL - Interleucina

Kgp – gingipaína K de 105 kDa

LBK – *lisil-bradykinin*, lisil-bradicinina

LK – *light kininogen*, cininogênio de baixo peso molecular

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPK - *Mitogen-activated protein kinases*, Proteína quinase ativada por mitógeno

MHC - *Major Histocompatibility Complex*, Complexo Maior de Histocompatibilidade

NEP – endopeptidase neutra

NF- $\kappa$ B - *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NO – *Nitric oxide*, Óxido Nitrico

*P. gingivalis* – *Porphyromonas gingivalis*

PI3K - *Phosphoinositide 3-kinase*, Fosfoinositideo 3-quinase

PKA – *Protein Kinase A*, Proteína quinase A

PMN - polimorfonuclear

RANKL - *Receptor Activator for Nuclear Factor  $\kappa$  B Ligand*, Ligante do receptor ativador para o fator nuclear  $\kappa$ B

RgpB – gingipaina R de 50 kDa

SCID - *Severe Combined Immunodeficiency*, Imunodeficiencia severa combinada

*T. cruzi* – *Trypanosoma cruzi*

tGPI – *glycosylphosphatidylinositols*, glicosilfosfatidilinositol

Th1 – *T helper 1*

Th17 – *T helper 17*

Th2 – *T helper 2*

TLR – *Toll like receptor*, Receptores do tipo Toll

TNF- $\alpha$  – Tumor necrosis factor-alpha, Fator de necrose tumoral-alfa

TRAF6 - TNF receptor-associated factor 6, Fator 6 associado ao receptor de TNF

## Sumário

		<b>Páginas</b>
1	Introdução	11
1.1	<i>Porphyromonas gingivalis</i> e Periodontite	11
1.2	Lipopolissacarídeo (LPS) de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	13
1.3	Fimbria	15
1.4	Gingipaína	18
1.5	Sistema Imune e a Perda Óssea – Osteoimunologia	19
1.6	Sistema Calicreina-Cinina	25
1.7	Sistema de Coagulação e Sistema Calicreina/Cininas	29
2	Objetivos	31
2.1	Objetivos Específicos	31
3	Materiais e Métodos	32
3.1	Camundongos e linhagens bacterianas	32
3.2	Moléculas bacterianas	33
3.3	Produção de citocinas em animais infectados com <i>P. gingivalis</i>	33
3.4	Produção de citocinas em animais imunizados com as moléculas de <i>P. gingivalis</i> purificadas e OVA	34
3.5	Depleção de PMN	34
3.6	Avaliação da formação de edema e produção de citocinas em animais pré-tratados com inibidor do FXII	35
3.7	Quantificação de citocinas – ELISA	36
3.8	Microscopia intravital	37
3.9	Análises estatísticas	38
4	Resultados	39
4.1	Importância do eixo inflamatório gingipaína/cinina/B <sub>2</sub> R para a montagem da resposta adaptativa T fimbria-específica do tipo Th1 e Th17	39
4.2	A ativação do eixo TLR2/B <sub>2</sub> R é essencial para montagem da resposta imunológica de células T fimbria-específicas em animais infectados	42

	intrabucalmente com <i>P. gingivalis</i>	
4.3	LPS e gingipaina purificados reproduzem o fenótipo inflamatório da bactéria <i>P. gingivalis</i> , induzindo a produção de IL-17 e IFN- $\gamma$ de forma dependente do eixo cininas/B <sub>2</sub> R	45
4.4	Depleção de PMN resulta na incapacidade dos linfócitos T fimbria-específica de animais infectados por <i>P. gingivalis</i> de montar uma resposta tipo Th1/Th17	47
4.5	O Perfil funcional de linfócitos T fimbria-específicos isolados do linfonodo submandibular de camundongos Balb/C após re-injecção com 10 <sup>7</sup> <i>P. gingivalis</i>	52
4.6	Ativação do sistema de contato é essencial para que haja resposta edematogênica e para a montagem da resposta anti-Fim Th1 e Th17	54
5	Discussão	58
	Referências	68

## 1 Introdução

### 1.1 *Porphyromonas gingivalis* e Periodontite

*Porphyromonas gingivalis* é uma bactéria gram negativa anaeróbia que está presente nos tecidos gengivais. Essa bactéria, pertencente ao gênero *Porphyromonas* da família Porphyromonadaceae (Naito *et al.*, 2008), coloniza os tecidos subgengivais, supragengivais, os quais constituem os primeiros sítios de colonização, e também está presente na saliva e nos tecidos moles da boca (Haffajee e Socransky, 1994).

A *P. gingivalis* é apenas uma das bactérias que contribuem para o desenvolvimento da periodontite (Socransky *et al.*, 1998). Essa doença ocorre em consequência de alterações na microbiota presente na placa dental. A progressiva substituição de espécies de bactérias gram-positivas por gram-negativas e anaeróbias está atrelada com o agravamento da inflamação gengival (Socransky *et al.*, 1998). Por motivos desconhecidos, alguns indivíduos desenvolvem uma forma progressiva de periodontite, que culmina na destruição das estruturas periodontais, inclusive do osso alveolar e os ligamentos periodontais, resultando na perda do dente (Lamont e Jenkinson, 1998).

A periodontite é uma doença que afeta vários grupos etários, podendo desenvolver-se em crianças, a partir dos primeiros dentes nascidos, até pessoas idosas. Além disso, ela varia muito de intensidade de paciente para paciente, taxa de progressão e no número de dentes afetados. Deve-se ressaltar que as bactérias encontradas em pacientes portadores da periodontite também estão presentes em pessoas saudáveis. Estudos mostram que o desenvolvimento da doença resulta do desequilíbrio entre fatores ecológicos da microbiota simbiote e os fatores do hospedeiro (Socransky *et al.*, 1998).

A colonização das bolsas gengivais pela *P. gingivalis* é facilitada por fatores ecológicos, como disponibilidade de nutrientes e a interação com as outras espécies do microambiente. As espécies bacterianas que formam o biofilme são agrupadas em complexos identificados por cores, sendo a *P. gingivalis* um componente do grupo mais patogênico, chamado complexo vermelho, juntamente com *B. forsythus*, *T. denticola*. Antes destas, a placa bacteriana é sucessivamente colonizada por bactérias dos complexos verde (*E. corrodens*, *C. gingivalis*, *A. actino*, etc.), amarelo (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *Streptococcus sp*, etc.) , roxo (*V. parvula*, *A. odontolyticus*) e laranja (*P. intermédia*, *P. micros*, *P. nigrescens*, etc.) (Haffajee e Socransky, 1994).

A conscientização da importância da *P. gingivalis* na periodontite ocorreu com a descoberta da formação de colônias pigmentadas, oriundas de culturas de lesões de pacientes adultos com periodontite (Mooney e Kinane, 1994), associada à presença de anticorpos contra esta bactéria no soro dos pacientes (Haffajee e Socransky, 1994). Conforme já mencionado, a *P. gingivalis*, assim como outras bactérias gram-negativas anaeróbias, contribuem com a iniciação e progressão das formas mais severas da doença, tanto na periodontite juvenil, quanto na adulta. Desta forma, a remoção das bactérias da placa favorece a manutenção das estruturas periodontais (Haffajee e Socransky, 1994)

Os tratamentos clínicos para prevenção da periodontite não são muito eficazes. Tanto a retirada mecânica das placas bacterianas, quanto os tratamentos com antibióticos não conseguem eliminar totalmente as espécies responsáveis pela periodontite, sendo freqüente a reincidência da doença. Isso ocorre, pois existem vários reservatórios nas cavidades orais dos pacientes, que promovem a reinfestação do mesmo, somando-se a probabilidade de adquirir a bactéria de outra pessoa. Além disso, existe a formação de um biofilme que promove estabilidade e proteção às colônias bacterianas (Gibson *et al.*, 2004; Kozarov *et al.*, 2005).

Alguns estudos mais recentes mostram que a *P. gingivalis* está associada com várias outras doenças sistêmicas, como a arteriosclerose (Liao *et al.*, 2009), artrite reumatóide (Hajishengallis, Wang, Bagby *et al.*, 2008) e pneumonia por aspiração (Socransky *et al.*, 1998).

Conforme já dito, a periodontite é causada por um processo inflamatório crônico promovido pelo biofilme depositado nos tecidos gengivais (Holt e Bramanti, 1991). Pelo fato de estar presente neste biofilme, a bactéria *P. gingivalis* contribui para o processo inflamatório crônico. Ela possui diversos fatores de virulência, algum dos quais apresentam atividade pró-inflamatória (Amano, Nakamura *et al.*, 1999; Chiang *et al.*, 1999; Kadowaki *et al.*, 2000; Asai *et al.*, 2001). Dentre os fatores melhor caracterizados do ponto de vista molecular, podemos mencionar moléculas presentes na parede celular da bactéria, como o LPS, a fimbria e a protease gingipaína (Chiang *et al.*, 1999).

## **1.2 Lipopolissacarídeo (LPS) de *Porphyromonas gingivalis***

O lipopolissacarídeo (LPS) é um dos principais componentes das paredes celulares de bactérias gram-negativas, e um fator de virulência da *P. gingivalis* (Opal, 2007). Ao agir diretamente no endotélio, o LPS promove vasodilatação e aumento da permeabilidade de vênulas capilares, efeitos que por sua vez estimulam a resposta imune (Mansheim *et al.*, 1978).

Cabe ressaltar que este LPS difere bioquimicamente do LPS clássico (i.e., derivado das enterobactérias) pelo fato de apresentar heptose e 2-ceto-3-deoxioctonato em sua estrutura (Aida *et al.*, 1995). Acredita-se que a maior parte das propriedades biológicas do LPS de *P. gingivalis*, especialmente a endotóxica, é atribuída à porção A do lipídeo, composta por uma única cadeia de ácido graxo considerado o centro bioativo desta molécula. O lipídeo A é basicamente composto por um único ramo de ácidos graxos com uma longa cadeia de carbono

e ausência de um grupo de fosforil na posição 4' da glicosamina (Faure *et al.*, 2000; Tabeta *et al.*, 2000; Hajishengallis *et al.*, 2006).

Sabe-se que os sinais secundários e reações intracelulares induzidos por LPS são mediados por receptores trans-membrana da família do tipo *Toll* (TLRs). Enquanto alguns dos membros da família TLR apresentam-se na superfície de células (TLR2, TLR4 e TLR5), outros tipos são expressos em vesículas intracelulares (TLR8 e TLR9). Esses receptores estão presentes em vários tipos celulares nos tecidos gengivais, nas células epiteliais, células endoteliais, monócitos/macrófagos e fibroblastos (Medzhitov, 2001). Entre os 11 TLRs humanos conhecidos (Sugawara *et al.*, 2000; Tabeta *et al.*, 2000), sabe-se que pelo menos dois destes, TLR2 e TLR4, funcionam como sensores de componentes da parede celular bacteriana (Yoshimura *et al.*, 2002).

O LPS da bactéria *P. gingivalis* difere da maioria dos LPS por apresentar grupamentos que ativam TLR2 (Darveau *et al.*, 2004). Entretanto, alguns autores sustentam que esta molécula também possui grupamentos reconhecidos por TLR4 (Burns *et al.*, 2006). Estudos recentes mostram que animais deficientes de TLR2 infectados por via subcutânea com *P. gingivalis*, apresentam perda óssea reduzida em comparação aos animais selvagens (Burns *et al.*, 2006). Esses autores observaram que estes animais deficientes apresentaram aumento da atividade fagocítica, atrelada a redução da bacteremia. Esse estudo mostra que a ativação de TLR2 pela bactéria pode favorecer seu escape a resposta imunológica (Gibson *et al.*, 2004; Kozarov *et al.*, 2005).

Como já mencionado, a bactéria *P. gingivalis* é relacionada como fator de risco para o desenvolvimento de arteriosclerose (Gibson *et al.*, 2004; Kozarov *et al.*, 2005), fato que é corroborado por sua presença nas placas de ateroma (Nakamura *et al.*, 2008). Um estudo mostrou que a estimulação do receptor TLR2 em linhagem de células endoteliais humanas (HUVEC) com o LPS de *P. gingivalis* promove, nestas células, aumento na expressão de

moléculas de adesão como ICAM-1 e VCAM-1, conseqüentemente permitindo maior adesão de monócitos ao endotélio vascular (Hajishengallis *et al.*, 2005), podendo causar aumento de migração celular e a amplificação do processo inflamatório.

### 1.3 Fimbria

A colonização dos tecidos subgingivais pela *P. gingivalis* depende de interações iniciais mediadas por fimbrias. Formadas por proteínas distintas, como fimbrilina (FimA) e as proteínas acessórias (FimCDE) (Amano, Nakagawa *et al.*, 1999), as fimbrias são apêndices filamentosos presentes em bactérias. Elas são responsáveis pela interação inicial entre a bactéria e o hospedeiro que irá posteriormente promover adesão do patógeno a célula e sua invasão (Deshpande *et al.*, 1998), principalmente em células endoteliais (Lamont *et al.*, 1995) e epiteliais (Takahashi *et al.*, 2006). Alguns autores propõem que a invasão de células endoteliais pela *P. gingivalis* é um evento importante na patogênese da arteriosclerose (Jotwani e Cutler, 2004; Graves *et al.*, 2005).

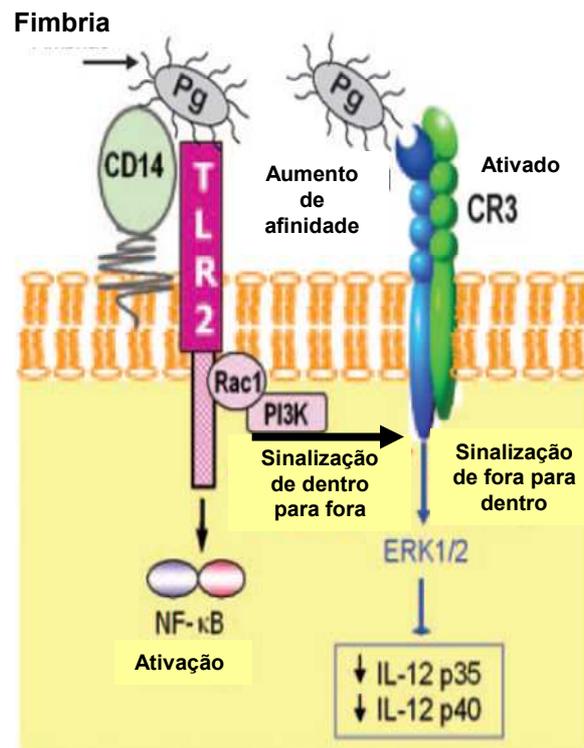
As fimbrias são estruturas imunogênicas, fato que se reflete pela presença de anticorpos específicos (IgG1) e a capacidade de estimulação de imunidade celular (Jotwani e Cutler, 2004). A infecção de células dendríticas humanas com linhagens de *P. gingivalis* fimbria-positivas, estimula a maturação dessas células e a produção, pelas mesmas, de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12 que presumivelmente contribuem para a patogênese da doença periodontal. Essas células, na presença de linfócitos T, induzem proliferação celular e polarização da resposta T CD4<sup>+</sup> para o subtipo Th1, com a produção predominante de IFN- $\gamma$  (Amano, 2003).

Durante o processo de delineamento da infecção, a *P. gingivalis* é capaz de invadir vários tecidos locais ou mais distantes do sítio de infecção, além de interagir com a matriz

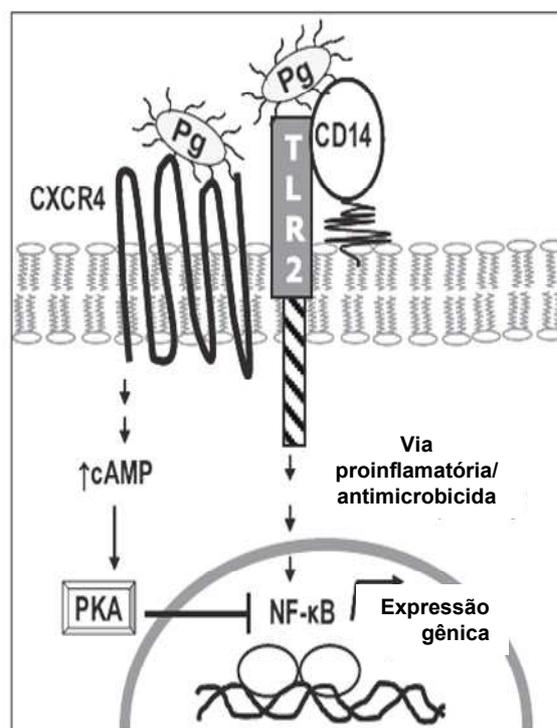
extracelular e integrinas (Lamont e Yilmaz, 2002). Em células epiteliais da gengiva sabe-se que o receptor para a fimbria é a integrina  $\beta_1$ . A invasão celular pela bactéria é acompanhada de rearranjo de citoesqueleto, aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma, modulação de MAPK e inibição da síntese de IL-8 (Asai *et al.*, 2001; Davey *et al.*, 2008).

Segundo alguns autores, a fimbria de *P. gingivalis* estimula TLR2 e TLR4 em células endoteliais (Hajishengallis *et al.*, 2006), epiteliais (Hajishengallis *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007) e macrófagos (Hajishengallis *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). Em alguns casos este estímulo funciona como mecanismo de escape bacteriano contra a resposta imune do hospedeiro. Como mostrado na Figura 1, ao se ligar no receptor do tipo Toll 2 em macrófagos, a fimbria induz uma sinalização intracelular, mediada por PI3K, que promove uma mudança conformacional do receptor de complemento CR3 deixando-o altamente específico a ligação com a própria fimbria. Esta interação causa a inibição da síntese de IL-12p70 e IFN- $\gamma$  e conseqüentemente a incapacidade dos macrófagos de controlar a infecção (Hajishengallis, Wang, Liang *et al.*, 2008).

Outro mecanismo de escape atribuído a fimbria está relacionado à sua capacidade de promover a dimerização de TLR2 com o receptor de quimiocina CXCR4, em *lipid rafts* (Figura 2). Essa dimerização leva a ativação de PKA, que por sua vez inibe a via de NF- $\kappa$ B previamente ativado via TLR2. Isso acarreta a inibição da síntese de NO e TNF- $\alpha$ , permitindo a sobrevivência e proliferação bacteriana nessas células (Kadowaki *et al.*, 2000; Imamura, 2003).



**Figura 1:** Mecanismo de escape via receptor CR3 (modificado a partir de Hajishengallis, Shakhatreh *et al.*, 2007)



**Figura 2:** Mecanismo de escape via heterodimerização de TLR2 e CXCR4 (modificado a partir de Hajishengallis, Wang, Liang *et al.*, 2008)

## 1.4 Gingipaína

Inicialmente acreditava-se que as proteases bacterianas apenas degradavam proteínas em aminoácidos, formando nutrientes para a bactéria. Entretanto, sabe-se hoje que as proteases são fatores de virulência bacterianos (Chen *et al.*, 1992; Potempa *et al.*, 1998). A *P. gingivalis* possui 3 cisteíno proteases distintas, coletivamente denominadas de gingipaínas. Dois dos genes que codificam gingipaínas, *rgpa* e *rgpb*, codificam para as gingipaínas R, assim chamadas porque clivam após ligações peptídicas na posição P1 do substrato (Arginina-Xaa). Os produtos destes genes, HRgpAs e RgpBs, apresentam massa molecular de 95kDa e 50kDa, respectivamente (Imamura, 2003). O terceiro gene (*kgp*) codifica a gingipaína K, uma protease de 105 kDa que cliva ligações peptídicas Lisina-Xaa (Onoe *et al.*, 1995; Nakayama *et al.*, 1996).

As gingipaínas (R e K) são responsáveis pela maturação de algumas proteínas bacterianas, dentre elas a fimbriolina. Elas clivam um longo peptídeo no N-terminal da proteína precursora da fimbriolina, que é a principal proteína formadora da fimbria, sendo desta forma responsáveis pela maturação da fimbria bacteriana (Imamura *et al.*, 1995). Além disso, as gingipaínas possuem atividade cininogénica, ou seja, elas são capazes de processar a molécula de cininogênio, gerando cininas, dentre elas a bradiginina (Wingrove *et al.*, 1992).

As gingipaínas comprometem a eficiência do sistema de defesa do hospedeiro, por exemplo, degradando (i) C3 e C5 do sistema complemento (Sugawara *et al.*, 2000) (ii) CD14 em monócitos (Yun *et al.*, 2007), (iii) a molécula co-estimulatória CD27 de linfócitos T (Mezyk-Kopec *et al.*, 2005) e (iiii) citocinas como TNF- $\alpha$  (Yun *et al.*, 1999) e IFN- $\gamma$  (Wingrove *et al.*, 1992). Wingrove e colaboradores, 1992, demonstraram que a gingipaína cliva as proteínas do complemento C3 e C5 gerando anafilotoxinas semelhantes a C3a e C5a. Os autores propuseram que a geração de C5a seria um importante fator para o recrutamento

de neutrófilos para o sítio da infecção. Uma vez dispersos no tecido inflamado, os neutrófilos secretam grânulos, que seriam responsáveis por um dano maior no tecido e por novas ondas de recrutamento celular agora com a chegada de monócitos e produção de IL-8, agravando a inflamação (Travis *et al.*, 1997).

Este corpo de evidências, aliado ao fato que as gingipaínas também degradam constituintes do tecido periodontal (Eley e Cox, 1996), sugerem que estas enzimas desempenham um papel relevante no desencadeamento e/ou manutenção da inflamação, contribuindo para a imunopatogênese da doença periodontal crônica. É interessante ressaltar que os níveis de gingipaína no fluido crevicular tendem a aumentar quando a doença periodontal está em plena atividade (Yun *et al.*, 2007). Além destas características as gingipaínas são capazes de ativar receptores do tipo PAR (receptores ativados por proteases), tanto em linfócitos T (Uehara *et al.*, 2008), quanto em monócitos (Horton *et al.*, 1972), neste caso podendo agir sinergisticamente com ligantes de TLR e NOD induzindo a síntese e secreção de IL-8.

### **1.5 Sistema Imune e a Perda Óssea – Osteoimunologia**

O envolvimento de imunidade celular na patogênese da periodontite crônica tem recebido crescente atenção. As interações entre sistema imune e sistema esquelético foram descritas na década de 70, através de trabalhos mostrando que osteoclastos são ativados por fatores solúveis secretados por leucócitos (Abu-Amer *et al.*, 1997).

Osteoclastos são células responsáveis pelo processo de reabsorção óssea. Eles têm origem hematopoiética e derivam de monócitos\macrófagos (Suda *et al.*, 1999; Teitelbaum, 2000). Para que estes se diferenciem em osteoclastos, processo este denominado

osteoclastogênese, é necessário que os monócitos\macrófagos recebam estímulos do microambiente.

O tecido ósseo é dinâmico e está em constante processo de remodelamento. A homeostase do tecido é mantida pelo equilíbrio entre a formação da matriz óssea pelos osteoblastos, e a degradação da mesma pelos osteoclastos (Dixon *et al.*, 2004). Este equilíbrio permite o contínuo remodelamento da matriz óssea, necessário para a manutenção da integridade do tecido e do reservatório celular para o processo de hematopoiese.

Em situações patológicas, como no processo inflamatório crônico característico da doença periodontal, há a liberação de fatores osteoclastogênicos que aceleram a reabsorção óssea (Holt e Bramanti, 1991; Chiang *et al.*, 1999). As bactérias responsáveis pelo desenvolvimento da periodontite possuem vários fatores de virulência, como é o caso do LPS de *P. gingivalis*, capazes de estimular o sistema imune (Kesavalu *et al.*, 2002) promovendo a secreção de citocinas, como a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Stashenko *et al.*, 1987; Gilbert *et al.*, 2000; Walsh *et al.*, 2006), ambas caracterizadas como inibidoras da diferenciação de osteoblastos (Takayanagi, 2005) e estimuladoras da expressão de RANKL (ligante do receptor ativador de NF-kB) (Kong, Yoshida *et al.*, 1999).

Sabe-se que o RANKL, uma molécula da família do TNF, possui um papel chave no processo de osteoclastogênese (Kong, Yoshida *et al.*, 1999), sendo expressa em osteoblastos (Quinn *et al.*, 2000; Shiotani *et al.*, 2001), fibroblastos (Kong, Feige *et al.*, 1999) e linfócitos T (Okahashi *et al.*, 2004; Wara-Aswapati *et al.*, 2007). A infecção de osteoblastos pela *P. gingivalis* induz a expressão de RANKL, estimulando o processo de osteoclastogênese e a reabsorção óssea (Okahashi *et al.*, 2004). A entrada da bactéria no osteoblasto não é importante para a expressão de RANKL uma vez que bactérias deficientes para fimbria são capazes de induzir sua expressão com a mesma eficácia que as bactérias selvagens (Burns *et al.*, 2006).

Alguns estudos indicam que o processo de reabsorção óssea pode ocorrer sem que haja participação da molécula RANKL. Ukai e colaboradores, 2008, mostraram que a infecção de macrófagos murinos pela *P. gingivalis* induz a produção de TNF- $\alpha$ , sendo esta citocina, sem a participação de RANKL, responsável pelo processo de osteoclastogênese. Este trabalho demonstrou que a produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos infectados e a reabsorção óssea promovida pelos mesmos são dependentes de sinalização via receptor TLR2. Um estudo anterior mostrou que animais deficientes para TLR2, infectados por via subcutânea com *P. gingivalis* apresentam perda óssea reduzida em comparação aos animais selvagens (Horne *et al.*, 1992). Corroborando com este estudo, outro grupo demonstrou que a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos estimulados com LPS, na ausência de RANKL, induz a expressão do protooncogene *c-src* responsável pela diferenciação destas células em osteoclastos (Han *et al.*, 2006). Contudo, de acordo com Lam e colaboradores, 2000, a ação osteoclastogênica de TNF- $\alpha$  depende de níveis basais de RANKL.

Além da contribuição dos osteoblastos, macrófagos e fibroblastos para osteoclastogênese, hoje se discute muito o papel dos linfócitos nesse processo. Alguns estudos mostram a contribuição de linfócitos B (Berglundh e Donati, 2005; Nakajima *et al.*, 2008) e T CD4<sup>+</sup> no processo de reabsorção óssea, uma vez que estas células estão presentes em tecidos acometidos pela periodontite (Berglundh e Donati, 2005). Nesses tecidos há uma preponderância de linfócitos B e plasmócitos (Anusaksathien *et al.*, 1992; Rajapakse e Dolby, 2004), com síntese de anticorpos contra *P. gingivalis* e auto-anticorpos contra proteínas próprias, como colágeno do tipo I (Govze e Herzberg, 1993) e desmossomos (Baker *et al.*, 1999), estruturas que compõem o tecido de suporte do dente e que são importantes para a integridade do tecido. Outros estudos mostram ainda, que camundongos imunodeficientes, que não possuem linfócitos T e B, ou animais deficientes para T CD4<sup>+</sup>, infectados pela via oral com *P. gingivalis*, são resistentes a perda óssea (Stashenko *et al.*, 2007). Apesar desses

estudos mostrarem que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> são importantes para o processo de osteoclastogênese, ainda é bastante controverso o papel dos subtipos Th1 e Th17, no processo de perda óssea.

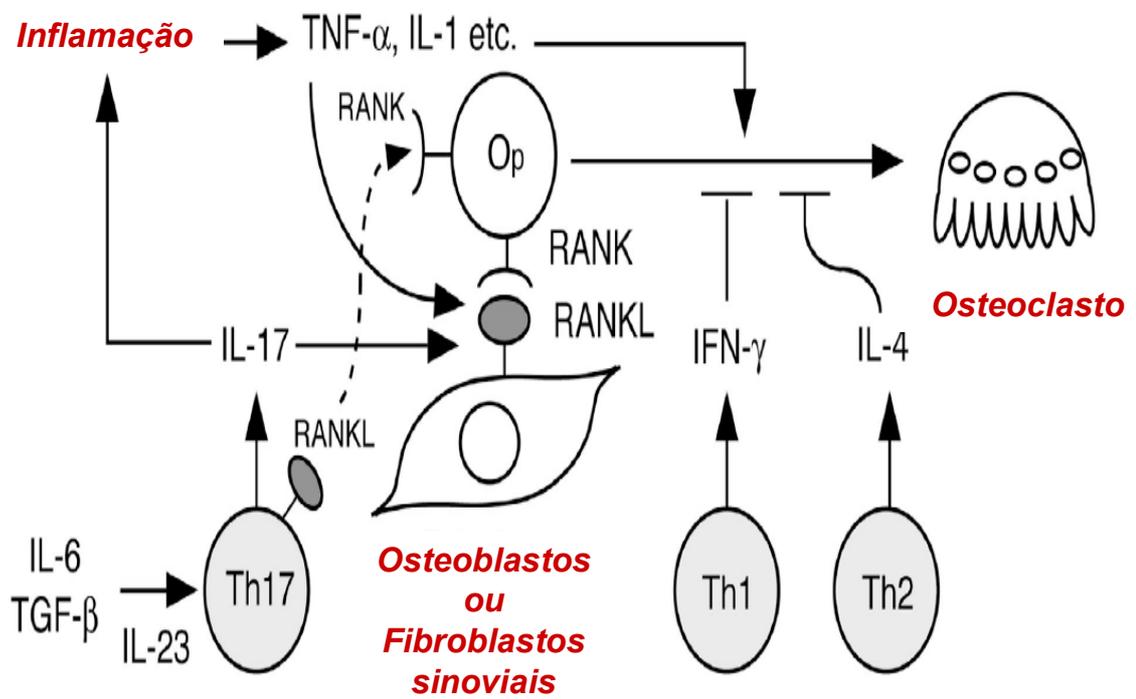
Alguns estudos defendem que a produção da citocina IFN- $\gamma$ , característica das respostas do tipo Th1, estimula o processo de osteoclastogênese. De acordo com Stashenko e colaboradores, 2007, em camundongos imunizados com uma combinação de antígenos de *P. gingivalis*, alum e IL-12, direcionando uma resposta polarizada Th1, com a produção de IFN- $\gamma$ , ocorre resposta inflamatória exacerbada com aumento de reabsorção (Gao *et al.*, 2007). Outro grupo verificou que animais deficientes em IFN- $\gamma$  apresentam reabsorção óssea reduzida, o que foi atribuído ao fato desta citocina ser responsável pelo aumento na expressão de MHC II, promovendo a maior ativação de linfócitos T e a expressão de RANKL pelas mesmas (Takayanagi *et al.*, 2000). Contudo, em outro estudo, verificou-se que o IFN- $\gamma$  bloqueia a osteoclastogênese, pois interrompe a sinalização via RANKL degradando a proteína adaptadora TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6), acarretando em uma forte inibição da ativação de NF- $\kappa$ B e c-Jun mediada por RANKL (Weaver *et al.*, 2006).

Existe também muita contradição na literatura quando se discute o papel de células Th17 na periodontite crônica. Essas células fazem parte de um subtipo de células T CD4<sup>+</sup> distintos, cuja diferenciação ocorre de forma independente dos subtipos Th1 e Th2 e são produtoras de IL-17 (Mangan *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007). As Th17 se originam e se estabelecem a partir do estímulo das citocinas TGF- $\beta$ , IL-6 e IL-23 (Nakashima *et al.*, 2000; Gaffen, 2004).

Estudos recentes mostram que o subtipo Th17 promove osteoclastogênese, devido ao aumento de expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 (Sato *et al.*, 2006) e RANKL pela IL-17. Conforme ilustrado na Figura 3, a IL-17 não age diretamente nos precursores de osteoclastos, mas sim nas células mesenquimais, como o osteoblasto, que fornecem os estímulos para as

precursoras de osteoclastos (Cardoso *et al.*, 2009). Vale ressaltar que grande quantidade de IL-17 foi encontrada em gengivas de pacientes com periodontite, comparado com gengivas saudáveis (Van Bezooijen *et al.*, 1999). Isso também é observado no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide em estágios bem elevados de perda óssea (Yu *et al.*, 2007).

Todavia, outros estudos mostram que a diminuição ou ausência de produção de IL-17 está associada com o desenvolvimento e progressão de algumas doenças. Camundongos deficientes para o receptor de IL-17, IL-17RA, apresentam uma elevada perda óssea quando infectados com a *P. gingivalis*. Estes estudos, no modelo de infecção aguda, observaram que os animais deficientes em IL-17RA apresentam reduzida migração de neutrófilos para o local da infecção, e conseqüentemente aumento da carga bacteriana (Ye *et al.*, 2001). Existem precedentes para esta observação, já que em infecções pulmonares com *Klebsiella pneumoniae* a presença de IL-17 é fundamental para o recrutamento de neutrófilos e o conseqüente controle da infecção (Couture *et al.*, 2001).



**Figura 3:** Processo de osteoclastogênese (modificado a partir de Sato, Suematsu *et al.*, 2006).

## 1.6 Sistema Calicreina-Cinina

As cininas são um grupo de peptídeos que contém de 9-11 aminoácidos que incluem a bradicinina (BK), a lisil-BK (LBK), e seus metabólitos (des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina ou des-Arg<sup>10</sup>—bradicinina). A BK ou a LBK são liberadas de cininogênio de alto peso molecular (HK) ou de baixo peso molecular (LK) pela ação das serino proteases, calicreinas plasmáticas e calicreinas tissulares, respectivamente (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). Os efeitos biológicos das cininas são mediados por dois subtipos de receptores, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Esses receptores possuem sete domínios transmembranares e pertencem a família dos receptores acoplados a proteína G heterotrimérica (Figura 4). O receptor B<sub>2</sub> é constitutivamente expresso em vários tipos celulares incluindo células endoteliais, músculo liso, neurônios (Aliberti *et al.*, 2003) e células dendríticas (Bhoola *et al.*, 1992; Marceau e Bachvarov, 1998), enquanto a expressão do receptor B<sub>1</sub> é restrita a tecidos inflamados. BK e a LBK são os agonistas de B<sub>2</sub>R enquanto que os metabólitos de BK ou LBK, des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina e des-Arg<sup>10</sup>—LBK, são os agonistas de B<sub>1</sub>R (Skidgel e Erdos, 2004; Moreau *et al.*, 2005).

As cininas são peptídeos de meia vida curta, porque sofrem rápida degradação e/ou metabolização por metalopeptidases nos tecidos e fluidos biológicos. Por exemplo, sabe-se que tanto a enzima conversora de angiotensina (ECA) quanto à endopeptidase neutra (NEP) degradam BK ou LBK, impedindo que estes peptídeos funcionem como agonistas de B<sub>2</sub>R, por outro lado, o processamento de BK ou LBK por carboxipeptidase M e/ou carboxipeptidase N gera os agonistas do receptor B<sub>1</sub>R (Imamura *et al.*, 1995).

As cininas exibem uma série de funções fisiológicas tais como regulação da pressão sanguínea, regulação das funções renais e cardíacas e proliferação celular. Além disso, sabe-se que determinados patógenos, como por exemplo, *P. gingivalis* (Svensjö *et al.*, 2006), *T. cruzi* e as espécies do complexo *Leishmania donovani*, expressam cisteíno proteases

“liberadoras” de cininas (Moreau *et al.*, 2005). Trabalhos publicados indicam que as cininas liberadas por estes patógenos induzem inflamação mediante ativação de receptores B<sub>2</sub>R e/ou B<sub>1</sub>R expressos no endotélio vascular, causando aumento de permeabilidade vascular (Aliberti *et al.*, 2003).

Em 2003, Aliberti e colaboradores mostraram que bradicinina exógena induz a maturação plena de células dendríticas CD11c<sup>+</sup> (mielóides), via ativação do receptor B<sub>2</sub>, com a produção pelas mesmas de IL-12 uma citocina que direciona a resposta de células T para o subtipo Th1 (Monteiro *et al.*, 2006; Monteiro *et al.*, 2007).

Mais recentemente, pesquisas realizadas pela nossa equipe demonstraram que a liberação de cininas pró-inflamatórias em tecidos infectados pelo *T. cruzi* é um evento chave para o desenvolvimento de linfócitos T efetores/memória de tipo 1 (Aliberti *et al.*, 2003). Depois da demonstração que a bradicinina induz a maturação plena de células dendríticas (Monteiro *et al.*, 2007), nosso grupo buscou relacionar os efeitos de sinalização de células dendríticas por cininas com o desenvolvimento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> imunoprotetores (tipo 1) em animais submetidos a desafio letal (infecção intraperitoneal) pelo *T. cruzi* (Ropert e Gazzinelli, 2004). Apesar de não terem esclarecido como as vias B<sub>2</sub>R e TLR/MyD88-dependentes (Monteiro *et al.*, 2006; Scharfstein *et al.*, 2007) interagem nos órgãos linfóides secundários, esses estudos mostraram que o acúmulo de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> efetores/memória no coração é criticamente dependente da ativação de células dendríticas por bradicinina proteoliticamente liberada (pela ação da cruzipaina) no espaço intersticial. Usando outro modelo, i.e., infecção subcutânea, o grupo verificou que a liberação de cininas em tecidos periféricos promove a migração de células dendríticas produtoras de IL-12p70 para linfonodos drenantes (Schmitz *et al.*, 2009).

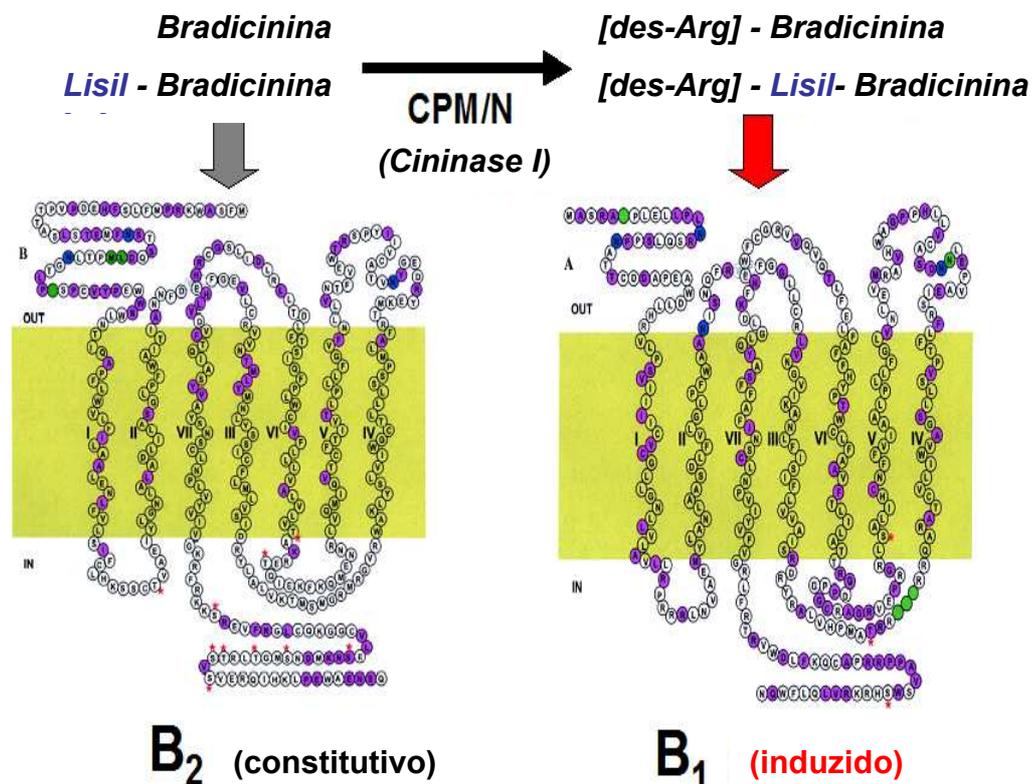
Relacionando os resultados, nosso grupo mostrou que a estimulação de TLR2 pela tGPI-mucinas (ligante de TLR2) resulta em secreção de citocinas e quimiocinas, que por sua

vez ativam o endotélio e neutrófilos (Aliberti *et al.*, 2003; Monteiro *et al.*, 2006; Monteiro *et al.*, 2007). Ao comprometer a barreira endotelial, estes eventos provocam um discreto extravasamento de plasma para o espaço intersticial. Em poucos minutos, as moléculas de cininogênio (entre outras proteínas de origem plasmática) difundem-se através da matriz extracelular, tornando-se alvo de ataque proteolítico pela cruzipaina. Uma vez liberadas, BK/LBK amplificam a resposta edematogênica inicial mediante ativação de B<sub>2</sub>R expressos no endotélio vascular. Este mecanismo de retroalimentação provoca o acúmulo progressivo de BK/LBK na periferia. Estes sinais induzem a maturação de células dendríticas pela via B<sub>2</sub>R, promovendo a migração das células dendríticas terminalmente diferenciadas para os linfonodos drenantes. Uma vez estacionadas nas áreas ricas em linfócitos T, as células dendríticas secretam IL-12p70, direcionando o perfil de resposta adaptativa para Th1 (Yoshimura *et al.*, 2002).

Diante destes resultados, nosso grupo iniciou o estudo do mecanismo de ativação do eixo TLR2/B<sub>2</sub>R no modelo de infecção bacteriana com *P. gingivalis*. Assim como *T. cruzi*, a bactéria possui um ligante de TLR2, o LPS bacteriano atípico (Imamura T, 1994; Imamura *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 2006), bem como uma cisteína protease, gingipaina, capaz de gerar bradicinina a partir do cininogênio (Monteiro *et al.*, 2009). Além disso, dispomos de bactérias mutantes deficientes em gingipaina, o que não foi possível nos estudos com o *T. cruzi*, uma vez que a cruzipaina é codificada por uma família multigênica, dificultando a obtenção de mutantes.

Dados recentes do grupo mostram que *P. gingivalis* é capaz de provocar edema tanto no modelo subcutâneo na pata quanto no modelo de infecção de mucosa bucal, em ambos os casos, dependente da via cinina/B<sub>2</sub>R. Isto foi demonstrado com a utilização de antagonistas do receptor B<sub>2</sub>, HOE 140, e de inibidores de gingipaina R, além da utilização de animais deficiente para B<sub>2</sub>R e de bactérias deficiente para Rggs. Neste mesmo estudo, o grupo

mostrou que a inflamação deflagrada pela *P. gingivalis* é iniciada através do reconhecimento do LPS bacteriano por TLR2, expresso por células sentinelas do sistema imune, o que foi caracterizado em camundongos deficiente para TLR2. Além disso, através de histologias da gengiva, mostramos que há recrutamento de polimorfonucleares na presença da bactéria ou das moléculas LPS/gingipaína, o que foi abolido com pré-tratamento com os inibidores, com a infecção com a bactéria deficiente ou nos camundongos deficiente para B<sub>2</sub>R e TLR2. Somando-se a esses resultados, mais adiante o processo edematogênico gerado pela infecção com *P. gingivalis* se mostrou dependente do recrutamento de neutrófilos, dado obtido em camundongos que tiveram seus neutrófilos depletados (Muller e Renne, 2008).



**Figura 4:** Sistema Cininas – Estrutura e agonistas dos receptores B<sub>2</sub> e B<sub>1</sub>

## 1.7 Sistema de Coagulação e Sistema Calicreína/Cininas

O sistema de coagulação é ativado através de duas cascatas proteolíticas interligadas. Uma destas vias é a via extrínseca deflagrada por lesão tecidual. A outra, denominada via intrínseca ou sistema de contato, se inicia com a ativação do fator XII (FXII).

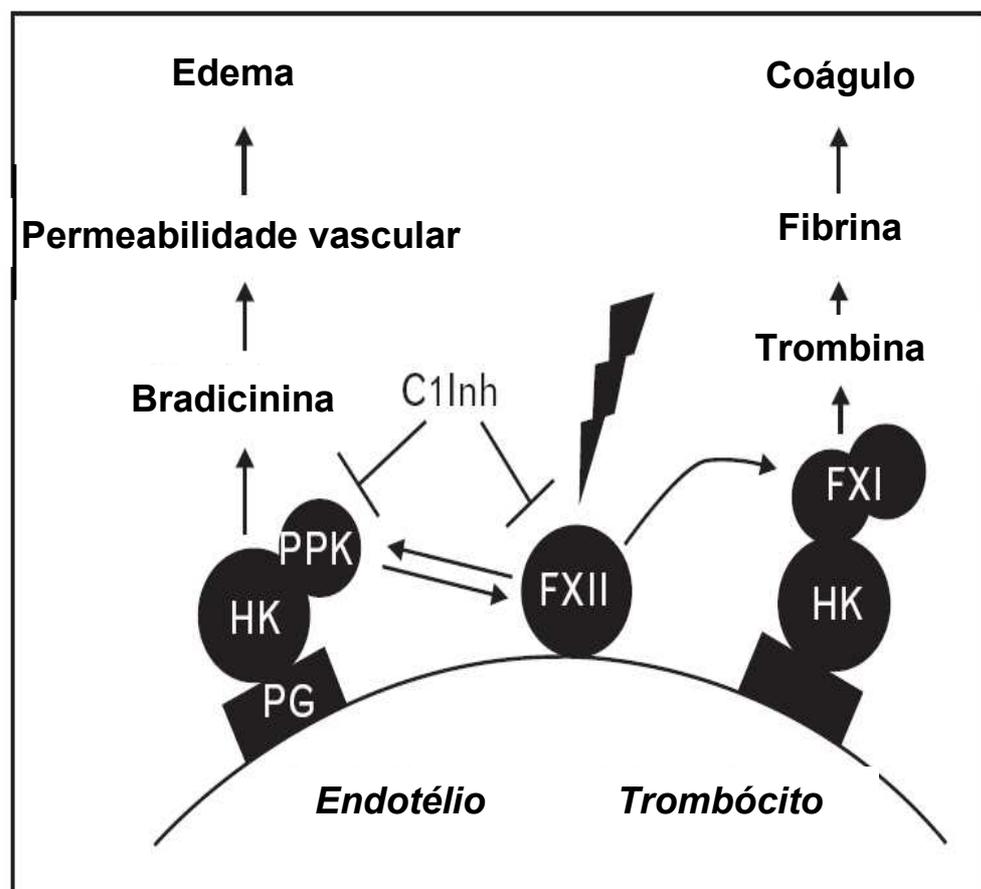
A via extrínseca se inicia com o dano vascular. A exposição de fator tecidual (FT) e a sua interação com o fator VII promovem ativação do último e a formação do complexo enzimático FT-VIIa. Este complexo é responsável pela ativação dos fatores IX e X, gerando os fatores IXa e Xa ativados, respectivamente. O fator IXa pode contribuir acelerando o processo já que também converte o fator X em Xa. O fator Xa é capaz de gerar trombina a partir da pró-trombina, que por sua vez irá gerar a fibrina a partir do fibrinogênio (Muller e Renne, 2008).

O sistema de contato é constituído pelo FXII, FXI, pré-calicreína e cininogênio. Quando o sistema é ativado, o FXII converte a pré-calicreína em calicreína, enzima que cliva o cininogênio, liberando cinina. O FXII também catalisa a conversão de FXI em sua forma ativa o que promove a geração de trombina e a formação de fibrina (Figura 5) (Muller e Renne, 2008).

Foi descoberto, que indivíduos deficientes em fator XII, não apresentam hemorragias espontâneas. Entretanto pessoas que são deficientes para C1Inh, uma proteína cuja função é regular a geração de bradicinina pela via intrínseca de coagulação, possuem produção exacerbada de bradicinina o que caracteriza uma doença denominada angioedema tipo I e II (Henderson *et al.*, 1994).

A ativação do sistema de contato pode ocorrer em superfícies celulares. Sabe-se que neutrófilos possuem moléculas de cininogênio, FXII, FXI e pré-calicreína em suas membranas onde pode ocorrer ativação do sistema de contato e a geração de cininas (Frick *et*

*al.*, 2006). Um estudo mostrou que há ativação do sistema de contato em superfícies de células bacterianas o que parece ser essencial para a geração de peptídeos antimicrobianos para o controle de infecções com *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus aureus* e *Salmonella* (Ben Nasr *et al.*, 1997). Antes disso, outro grupo demonstrou haver geração de bradicinina durante ativação do sistema de contato na superfície celular de *Streptococcus pyogenes* (Nguyen *et al.*, 2007). Portanto, não se pode ignorar a importância do sistema de contato no curso de processos infecciosos e inflamatórios, inclusive durante o desenvolvimento da doença periodontal.



**Figura 5:** Sistema de Contato (modificado a partir de Muller e Renne, 2008)

## 2 Objetivos

Estudar o papel do Sistema Cininas e do receptor TLR2 nos mecanismos de integração entre imunidade inata e imunidade adaptativa na infecção bucal por *P. gingivalis*.

### 2.1 Objetivos específicos

1 - Utilizando o modelo murino (camundongos) de infecção pela bactéria *P. gingivalis*, pretende-se determinar se a ativação de receptores de TLR2 e bradicinina (B<sub>2</sub>R) nas etapas iniciais de inflamação gengival é capaz de direcionar o perfil funcional da resposta adaptativa Th;

2 - Verificar se os fatores de virulência LPS e gingipaína de *P. gingivalis*, envolvidos no mecanismo de inflamação gengival controlada pelo eixo TLR2/B<sub>2</sub>R, são capazes de reproduzir o fenótipo bacteriano;

3 - Verificar se a ativação do eixo TLR2/B<sub>2</sub>R modula diferencialmente o perfil de resposta Th1/Th17 (anti-fimbria) em linfonodos drenantes de camundongos BALB/c *versus* C57BL/6 infectados;

4 - Avaliar a importância de neutrófilos na indução de uma resposta adaptativa tipo Th1/Th17 em animais infectados por *P. gingivalis* e/ou depletados de PMN;

5 - Verificar a participação da via intrínseca de coagulação nas etapas iniciais de inflamação gengival e no direcionamento do perfil funcional da resposta adaptativa Th.

### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Camundongos e linhagens bacterianas

Os experimentos foram realizados com as linhagens de camundongos BALB/c, C57BL/6 e TLR2<sup>-/-</sup>. A linhagem de *P. gingivalis* W83 e sua mutante no gene Rgps (linhagem ΔRgps; obtida por deleção isogênica dos genes de *rgpA* e *rgpB*) (cedida pelo Dr. Jan Potempa, University of Louisville School/ Jagiellonian University) foram crescidas em anaerobiose a 37°C em BHI (brain heart infusion) com 0,5 % de extrato de levedura, suplementado com L-cisteína (0,5 g/L), hemina (5 mg/mL) e menadiona (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich). A linhagem mutante, ΔRgpa, foi criada por uma deleção mutagênica como descrito previamente (Hamada *et al.*, 1996). Rapidamente, uma seqüência de primer (5'-ATGAGAGTATCGCTGATTAATTCACACTGCAATTCTCTAATAAAGG, 5'-TAATTCACACTGCAATTCTCTAATAAGGGC, 5'-CAGCGATACTCTCATTTAATTTGATGATAGCCTTACCG e 5'-TAATTTGATGATAGCCTTACCGTCTTTCACG) foi usada para promover a deleção dos genes *rgpa* e *rgpb*. Recombinação homologa do plasmídeo modificado na linhagem RgpA resultou numa perda total de RgpB como determinado por um ensaio enzimático e por Western blot.

Nos ensaios de infecção, a bactéria foi lavada e injetada nos animais em tampão próprio, pH 8 (0,234g Tris-HCl; 0,2631g de NaCl<sub>2</sub>; 0,02205g CaCl<sub>2</sub> e 0,01818g de L-cisteína, em 30 ml de água apirogênica).

### 3.2 Moléculas bacterianas

Fimbria (Fim) de *P. gingivalis* 332277 foi purificada de acordo com o método previamente descrito (Riedemann *et al.*, 2004; Monteiro *et al.*, 2006) (cedida pelo Dr. Jan Potempa, University of Louisville School/ Jagiellonian University). Brevemente a linhagem de *P. gingivalis* foi centrifugada a partir de uma cultura de 4 L de meio BHI. O *pellet* de bactéria foi ressuspensão em tampão Tris e ultrasonicado em banho de gelo. As fimbrias do sobrenadante foram concentradas com sulfato de amônia e purificadas por cromatografia em uma coluna de DEAE-Sefarose CL-6B. A análise em SDS-PAGE mostrou uma banda maior e uma menor de proteína, indicando que a mistura de FimA e Mfa1 (fimbria menor) foram obtidas. O preparado de fimbria foi testado para a presença de endotoxina, com resultado negativo (<6 EU/mg de proteína), de acordo com o teste quantitativo *Limulus ameboocyte lysate assay* (BioWhittaker).

### 3.3 Produção de citocinas em animais infectados com *P. gingivalis*

Animais BALB/c, C57BL/6 e TLR2<sup>-/-</sup> foram pré-tratados ou não com HOE-140 (100 µg/kg, diluído em água apirogênica, 50 µl via subcutânea). Uma hora depois, os animais foram infectados, intrabucalmente, com 10<sup>4</sup> *P. gingivalis* W83 selvagem (WT). Grupos separados foram inoculados (i) com a mesma concentração de bactéria WT pré-tratada com inibidor de gingipaina (100 nM), D-Phe-Pro-Arg-chloromethyl ketone (Bachem), (ii) ou com as bactérias deficientes de Rgps, a linhagem ΔRgps. Para análise da resposta adaptativa, os animais receberam um reforço, intrabucal, com fimbria fervida (1 µg/animal) dez dias após a infecção e sete dias após o reforço os animais foram sacrificados e seus linfócitos T retirados

do linfonodos submandibular. Os linfócitos foram cultivados e estimulados com fimbria fervida (0,1 µg/ml) por 72 h a 37°C.

### **3.4 Produção de citocinas em animais imunizados com as moléculas de *P. gingivalis* purificadas e OVA**

Animais BALB/c foram pré-tratados ou não com HOE-140 (100 µg/kg) (via subcutânea). Uma hora depois os animais foram imunizados intrabucalmente com as moléculas de *P. gingivalis* (RgpB 10 nM e LPS 7,5 nM) combinadas com OVA (50 µg/animal) pré-adsorvida a hidróxido de alumínio (5 mg/animal). Após dez dias os animais receberam reforço de OVA (25 µg/ml). Sete dias após o reforço os animais foram sacrificados e seus linfócitos T retirados do linfonodos submandibulares. Os linfócitos foram cultivados e estimulados com OVA (2,5 µg/ml) por 72 h a 37°C.

### **3.5 Depleção de PMN**

Animais TLR2<sup>-/-</sup> ou BALB/c depletados de PMN foram infectados intrabucalmente com 10<sup>4</sup> *P. gingivalis* contendo 10 µg/animal de cininogênio humano purificado de alto peso molecular (HK) (Calbiochem). A depleção dos polimorfonucleares ocorreu 18 h antes da infecção, pela injeção intraperitoneal de 0,45 ml de anticorpo de coelho anti-PMN (Accurate Chemical Corporation) na diluição de 1:10. Como controle, um grupo foi pré-tratado com o mesmo volume de soro normal de coelho (Monteiro *et al.*, 2006). Como indicado os animais foram pré-tratados com HOE-140 (100 µg/kg) (via subcutânea) uma hora antes da infecção.

Como controles adicionais os animais TLR2<sup>-/-</sup> ou BALB/c depletados de PMN foram inoculados com uma suspensão de bactéria ΔRgps suplementada com HK purificado. Após dez dias os animais receberam reforço de fimbria fervida (1 μg/animal). Sete dias após o reforço os animais foram sacrificados e seus linfócitos T retirados do linfonodos submandibular. Os linfócitos foram cultivados e estimulados com fimbria fervida (0,1 μg/ml) por 72 h a 37°C.

### **3.6 Avaliação da formação de edema e produção de citocinas em animais pré-tratados com inibidor do FXII.**

Animais BALB/c foram pré-tratados ou não com HOE-140 (100 μg/kg) (via subcutânea) ou com inibidor do FXII intravenoso (0,5 mg/animal) (Cedido pelo Dr. Thomas Renné, Karolinska Institute, Estocolmo, Suécia). Uma hora depois, os animais foram infectados com 10<sup>4</sup> *P. gingivalis* W83 ou com 2 x 10<sup>6</sup> *T. cruzi* subcutaneamente na pata. A análise de edema de pata foi feita 3 h após a infecção e a intensidade do edema foi avaliado por deslocamento de volume, medido com uma bomba peristáltica (Microperpex Peristaltic Pump - LKB Bromma) (Svensjö E, 2006; Svensjö *et al.*, 2009). Para análise da resposta adaptativa, os animais receberam um reforço com fimbria fervida (1 μg/animal) dez dias após a infecção e sete dias após o reforço os animais foram sacrificados e seus linfócitos T retirados do linfonodo poplíteo. Os linfócitos foram cultivados e estimulados com fimbria fervida (0,1 μg/ml) por 72 h a 37°C.

### 3.7 Quantificação de citocinas – ELISA

Para avaliarmos a concentração das citocinas IL-17 e IFN- $\gamma$ , produzidas pelos linfócitos T fimbria-específicos ou OVA-específicos dos animais infectados com a *P. gingivalis* e liberadas nos sobrenadantes das culturas, nós utilizamos a técnica de ELISA (R&D System) (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). As células totais dos linfonodos foram cultivadas a 37°C por 72 horas em placas de cultura de 96 poços, fundo redondo, com 10<sup>6</sup> células por poço.

Primeiramente, placas de ELISA (Nunc, Roskilde, Dinamarca) foram sensibilizadas com 50  $\mu$ L de anticorpo de captura contra IL-17 (2  $\mu$ g/mL em PBS) (R&D System) ou IFN- $\gamma$  (4  $\mu$ g/ml em PBS) (R&D System) e incubadas por 24 horas à 25°C. Em seguida, foram bloqueadas com PBS contendo 1 % de BSA por 1 hora à 25 °C e lavadas 3 vezes com PBS contendo 0,05% Tween20. As amostras de sobrenadante foram adicionadas à placa de ELISA (50  $\mu$ L) e incubadas por 2 horas à 25 °C. Após 3 lavagens com PBS contendo 0,05% Tween20 foi adicionado anticorpo anti-IL-17 murino biotilado (400 ng/ml em PBS 1 % BSA) (R&D System) ou anticorpo anti-IFN- $\gamma$  murino biotilado (800 ng/ml em PBS 1 % BSA) (R&D System) por 2 horas à 25 °C. Após esta etapa de detecção a placa foi lavada 3 vezes com PBS contendo 0,05% Tween20 e incubada com streptavidina (R&D System) por 20 min à 25°C. Após os 20 min, a placa foi novamente lavada 3 vezes com PBS contendo 0,05% Tween20 e adicionado o substrato (R&D System). A reação foi interrompida através da adição de 25  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N e a absorbância à 450nm, medida em leitor de ELISA (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA).

### 3.8 Microscopia intravital

Hamsters machos (*Mesocricetus auratus*, 90-120g) foram anestesiados com 0,1-0,2 ml de pentobarbital sódico (60 mg/ml) intraperitoneal, suplementado com doses intravenosas de  $\alpha$ -cloralose (100 mg/kg). A temperatura corporal dos animais foi mantida por meio de uma manta aquecedora, controlada por um termistor retal. Para facilitar a respiração espontânea foi feita traqueotomia. A veia femoral direita foi canulada para injeções de FITC-dextran (TdB Consultancy, Uppsala, Suécia) e de  $\alpha$ -cloralose (Sigma Chemicals, St. Louis, EUA). A bolsa da bochecha dos hamsters foi preparada para a microscopia intravital como descrito previamente (Monteiro *et al.*, 2009). Resumidamente, a bolsa da bochecha foi continuamente superfundida com uma solução salina aquecida (35°C) tamponada com bicarbonato e HEPES (composição em mM: NaCl: 110; KCl: 4,7; CaCl<sub>2</sub>: 2,0; MgSO<sub>4</sub>: 1,2; NaHCO<sub>3</sub>: 18,0; HEPES: 15,4 e HEPES.Na<sup>+</sup>: 14,6) para manter o pH em 7,4, e borbulhada com uma mistura de N<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (95: 5 %), para manter uma pressão parcial de O<sub>2</sub> baixa. A velocidade de superfusão da solução foi de 5 ml/min. A observação da micro circulação na bochecha do hamster foi feita usando o microscópio Axioskop 40, com objetiva 4X e ocular 10X (Carl Zeiss, Germany) equipada com filtros apropriados para a observação da fluorescência (490/520 nm, FITC-dextran). Uma câmera digital, AxioCam HRc e um computador equipado com o programa AxioVision 4.4 Software (Carl Zeiss, Germany) foram usados para analisar as imagens. Os diâmetros e a fluorescência total das bochechas dos hamsters foram capturados em uma área retangular representativa com 5 mm<sup>2</sup>. A fluorescência capturada 30 min após a injeção de FITC-dextran, em cada experimento, foi ajustada para 2000 unidades de fluorescência por questões estatísticas e os diâmetros das arteríolas (variando de 30-80  $\mu$ m) neste mesmo tempo foram definidas como 100 %. As imagens foram feitas e salvas a cada 5 min durante todo o experimento e a fluorescência observada na área (5 mm<sup>2</sup>) foi usada como

medida de extravasamento de plasma. Nos experimentos as suspensões de bactéria (500 µl em Tampão de bactéria) foram aplicadas duas vezes com intervalo de 35 a 40 min. A primeira série de experimentos consistiu em dois grupos de hamsters: (i) grupo controle (n = 4) onde a bochecha do hamster foi exposta duas vezes a W83 *P. gingivalis* (ii) e um grupo teste, envolvendo o grupo controle seguido do tratamento com Repertaxina, antes da primeira injeção de W83 *P. gingivalis* (5 min), ou antes da segunda injeção de bactéria. Uma vez que a fluorescência após a segunda aplicação voltou aos níveis iniciais, foi feita aplicação de BK (520 nM) durante 5 min para que tivéssemos certeza dos efeitos da Repertaxina, excluindo uma possível exaustão do sistema.

### **3.9 Análises estatísticas**

Utilizamos o teste de Turkey, para comparação par a par dos dados de concentração das citocinas IL-17 e IFN- $\gamma$  obtidas por ELISA. Utilizamos ainda, o teste ANOVA para as comparações entre os diferentes grupos experimentais. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como indicativos de significância estatística entre os grupos.

A análise estatística realizadas nos experimentos de microscopia intravital foi o Teste-t pareado, comparando as respostas da primeira aplicação de bactéria com a segunda aplicação. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados como indicativos de significância estatística entre os grupos.

## 4 Resultados

### 4.1 Importância do eixo inflamatório gingipaína/cinina/B<sub>2</sub>R para a montagem da resposta adaptativa T fimbria-específica do tipo Th1/Th17

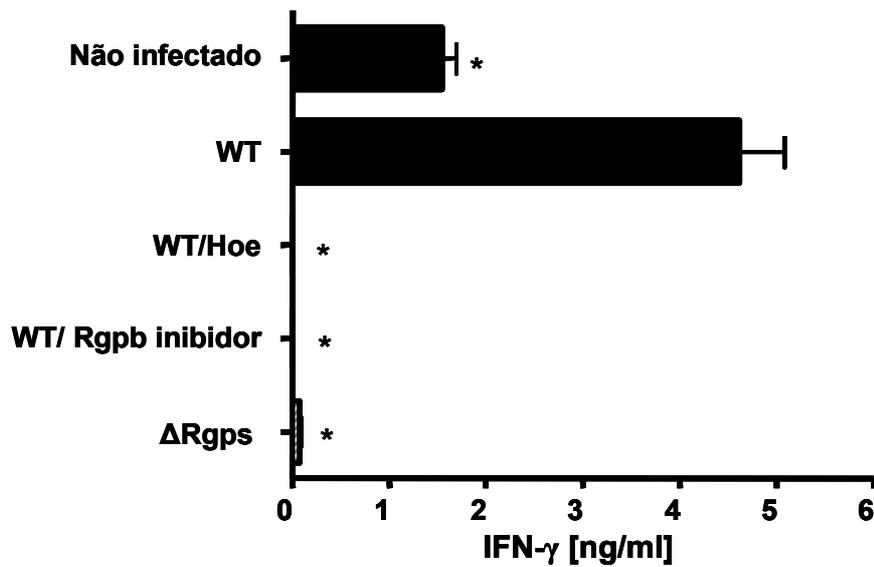
Baseados em dados preliminares do grupo, onde foi demonstrado que a infecção intrabucal pela *P. gingivalis* induz resposta edematogênica dependente da geração de cininas pela protease gingipaína, nós avaliamos o papel deste eixo inflamatório inicial gingipaína/cininas/B<sub>2</sub>R na modulação do perfil funcional de linfócitos T, específicos para o antígeno fimbria, nos linfonodos submandibulares de camundongos.

Infectamos camundongos BALB/c intrabucalmente com  $10^4$  *P. gingivalis* selvagens (WT) ou com a linhagem deficiente para as R gingipaínas ( $\Delta$ Rgps) ou ainda com a bactéria WT pré-tratada por 20 min com o inibidor irreversível da protease gingipaína (D-Phe-Pro-Arg-chloromethyl ketone). Uma hora antes um grupo foi pré-tratado com o antagonista de B<sub>2</sub>R, HOE-140. Dez dias depois os camundongos receberam um reforço com o antígeno fimbria e sete dias após o reforço os animais foram sacrificados e seus linfócitos T foram retirados dos linfonodos submandibulares. Esses linfócitos foram estimulados *in vitro* com fimbria e cultivados a 37°C por 72 h. Os sobrenadantes foram recolhidos e por ELISA foi avaliada a síntese de IL-17 e IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T fimbria-específicos.

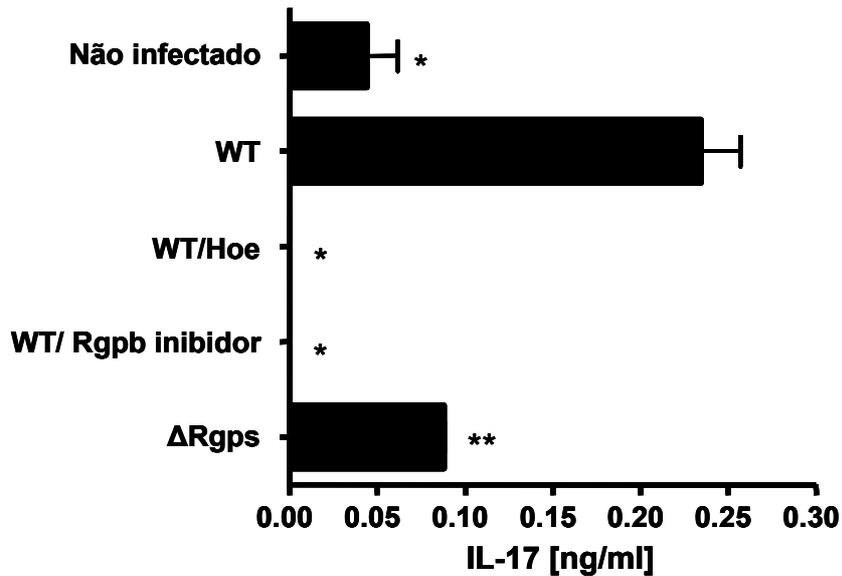
Podemos observar nas Figuras 6A e 6B que os linfócitos T fimbria-específicos dos camundongos infectados com a bactéria WT tiveram um aumento na produção de IFN- $\gamma$  e IL-17, em relação ao valor basal dos camundongos não infectados. Os linfócitos T fimbria-específicos dos camundongos pré-tratados com HOE-140 tiveram a produção de citocinas praticamente anulada, o que implica a participação do receptor B<sub>2</sub> neste fenômeno. Assim como com os camundongos tratados com HOE-140, os linfócitos T fimbria-específicos dos

camundongos infectados com a bactéria WT, tratada com o inibidor de gingipaína ou aqueles infectados com a bactéria  $\Delta Rgps$ , tiveram a produção de IFN- $\gamma$  e IL-17 intensamente reduzidas. Estes dados indicam a importância do eixo inflamatório inicial gingipaína/cinina/B<sub>2</sub>R para que haja a montagem de uma resposta adaptativa T fimbria-específica do tipo Th1 e Th17.

A



B



**Figura 6: Importância do eixo inflamatório gingipaína/cinina/B<sub>2</sub>R para a montagem da resposta adaptativa T fimbria-específica do tipo Th1 e Th17.** Camundongos BALB/c foram pré-tratados ou não com HOE-140 (100  $\mu$ g/kg) (s.c), 1 h antes da infecção intrabucal com 10<sup>4</sup> *P. gingivalis* WT, WT pré tratada com inibidor da gingipaína (100 nM), D-Phe-Pro-Arg-chloromethyl ketone ou com a bactéria deficiente  $\Delta$ Rgps. Dez dias depois os animais receberam reforço com fimbria (1 $\mu$ g/animal). Os linfonodos submandibulares foram retirados sete dias após o reforço, e foram estimulados com fimbria (100 ng/mL) por 72 hs a 37°C. Os sobrenadantes foram recolhidos e por ELISA foi avaliada a síntese de IFN- $\gamma$  (A) e IL-17 (B) pelos linfócitos T fimbria-específicos. Os resultados são representativos de três experimentos independentes, com resultados similares (n=5, por grupo). As diferenças foram analisadas por ANOVA e as comparações par a par foram feitas pelo teste de Tukey (\*, p< 0,001 e \*\*, p<0,01).

#### **4.2 A ativação do eixo TLR2/B<sub>2</sub>R é essencial para montagem da resposta imunológica de células T fimbria-específicas em animais infectados intrabucalmente com *P. gingivalis***

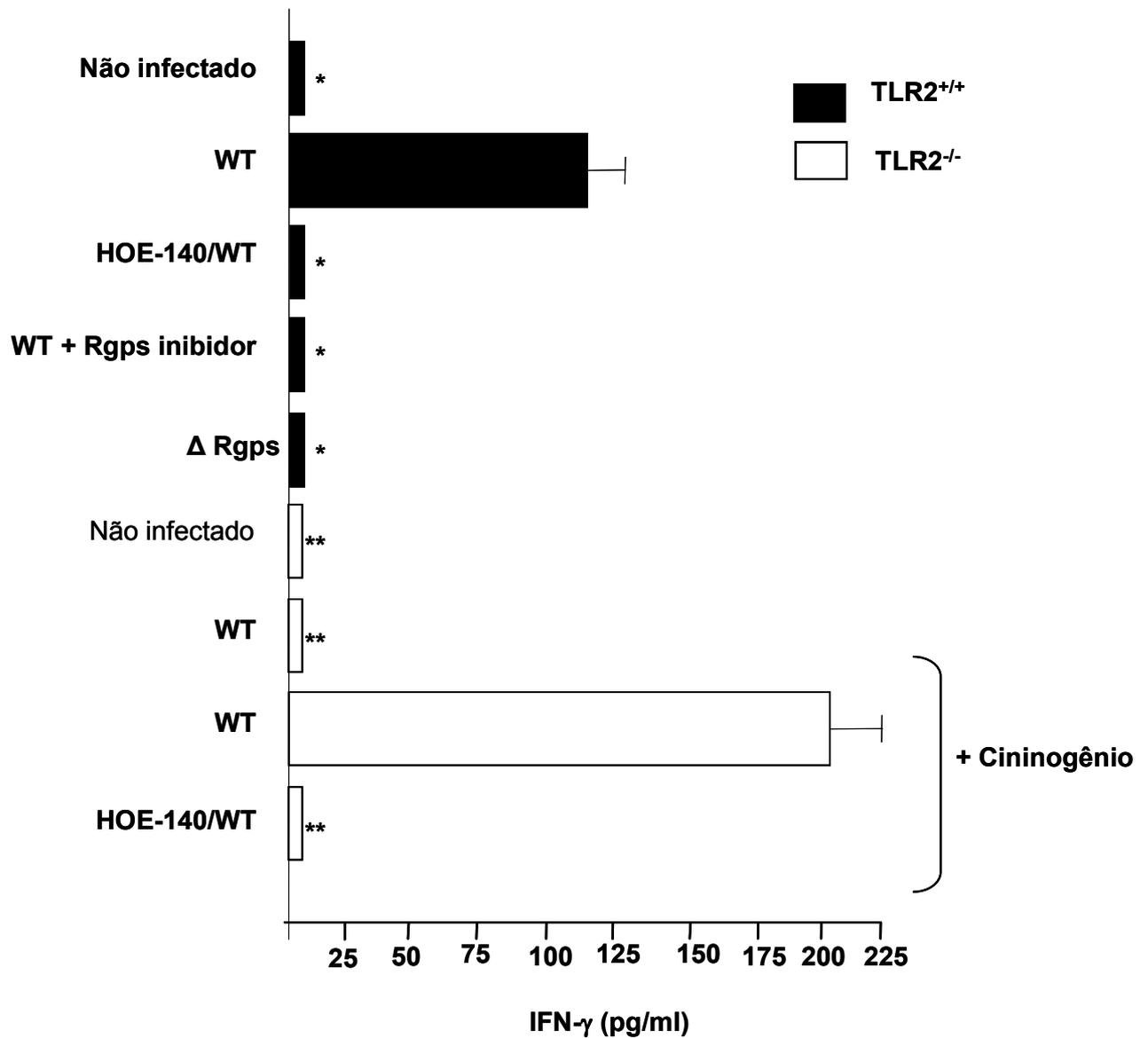
Sabemos que a resposta edematogênica gerada pela infecção intrabucal com *P. gingivalis* é dependente da ativação do receptor TLR2 pelo LPS bacteriano (Monteiro *et al.*, 2009; Schmitz *et al.*, 2009). Para avaliar o papel do eixo TLR2/B<sub>2</sub>R na indução de uma resposta T fimbria-específica, nós utilizamos camundongos C57BL/6 WT ou TLR2<sup>-/-</sup>. Esses animais foram infectados intrabucalmente com 10<sup>4</sup> *P. gingivalis* WT, ou ΔRgps, ou ainda com a bactéria WT pré-tratada, por 20 min, com o inibidor da gingipaina. Uma hora antes da infecção um grupo de animais foi pré-tratado com HOE-140. Alguns animais TLR2<sup>-/-</sup> receberam, junto com a injeção de bactéria WT, HK (cininogênio humano de alto peso molecular), como fonte externa de substrato para gingipaina. Dez dias depois os camundongos receberam um reforço com o antígeno fimbria e sete dias após o reforço os animais foram sacrificados e seus linfócitos T foram retirados dos linfonodos submandibulares. Esses linfócitos foram estimulados *in vitro* com fimbria e cultivados a 37°C por 72 h. Os sobrenadantes foram recolhidos e por ELISA foi avaliada a síntese de IFN-γ pelos linfócitos T fimbria-específicos.

Nos animais C57BL/6 WT nós observamos a produção de IFN-γ, pelos linfócitos T específicos para fimbria, somente no grupo infectado com a bactéria WT (Figura 7). Os tratamentos com HOE-140, com a bactéria ΔRgps ou com a bactéria WT tratada com o inibidor da gingipaina não induziram a produção de IFN-γ. Os linfócitos T fimbria-específicos dos camundongos TLR2<sup>-/-</sup> infectados com a bactéria selvagem não tiveram a produção desta citocina induzida. Contudo, surpreendentemente, quando esses animais foram infectados com a bactéria WT juntamente com HK observamos a restauração da produção de IFN-γ pelos

linfócitos T fimbria-específicos, o que novamente foi abolida com o pré-tratamento com HOE-140.

Coletivamente, estes resultados indicam que HK exógeno transpassa a necessidade do influxo de cininogênio plasmático mediado pela ativação de TLR2. Em outras palavras, HK exógeno é processado proteoliticamente pela gingipaína, liberando agonistas de B<sub>2</sub>R que agem como adjuvante direcionado a resposta para um perfil Th1, restaurando a disfunção imune dos animais deficiente em TLR2.

Não fomos capazes de observar a síntese de IL-17 nos camundongos C57BL/6 WT ou TLR2<sup>-/-</sup> (dado não mostrado).

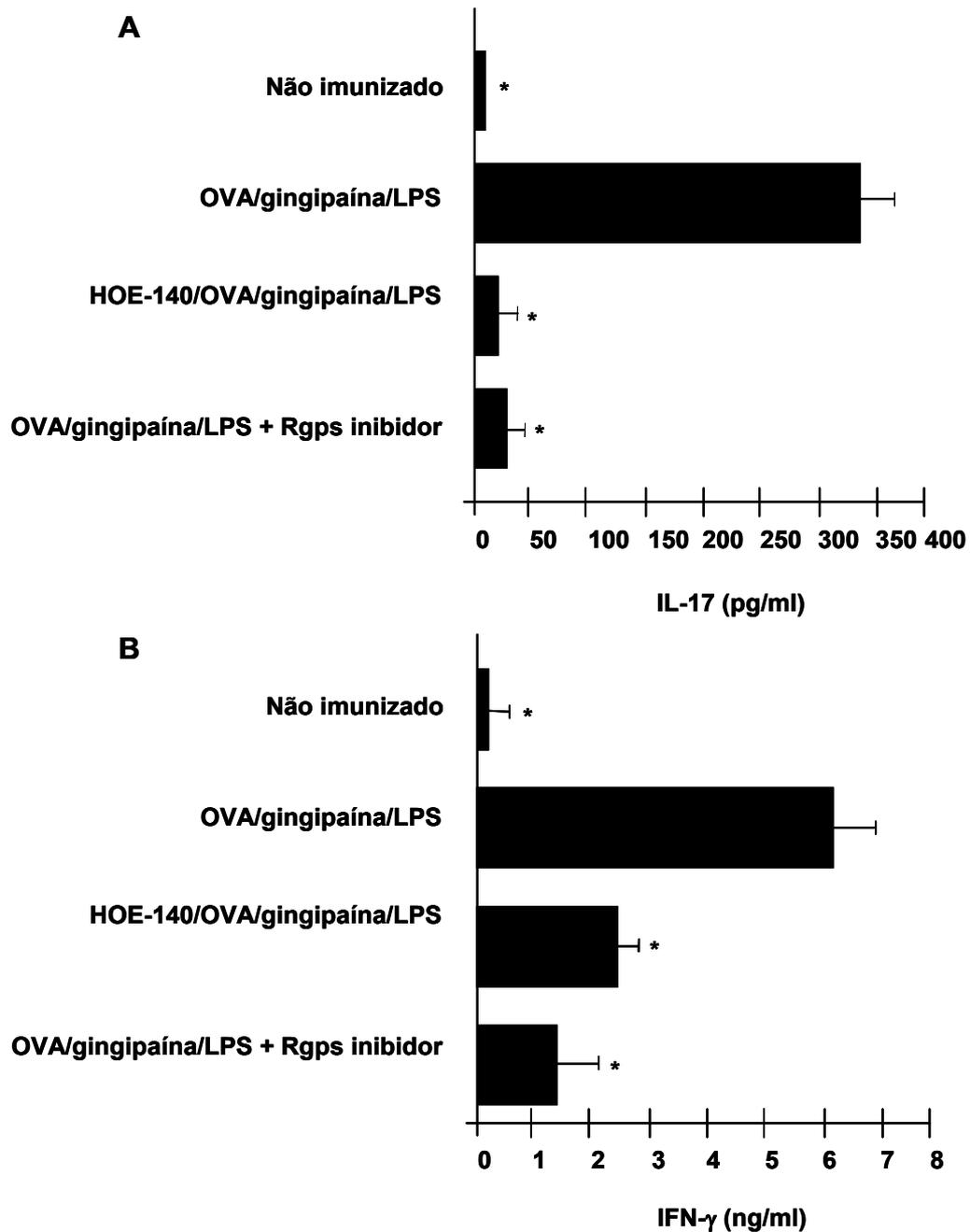


**Figura 7:** A ativação do eixo TLR2/B<sub>2</sub>R é essencial para montagem da resposta imunológica de células T fimbria-específicas em animais infectados intrabucalmente com *P. gingivalis*. Camundongos C57BL/6 foram pré-tratados ou não com HOE-140 (100  $\mu$ g/kg) (s.c), 1 h antes da infecção intrabucal com 104 *P. gingivalis* WT ou WT pré tratada com inibidor da gingipaína, D-Phe-Pro-Arg-chloromethyl ketone ou com a bactéria deficiente  $\Delta$ Rgps. Em um segundo esquema, camundongos TLR2<sup>-/-</sup>, pré-tratados ou não com HOE-140, como indicado, foram infectados com suspensões contendo 104 *P. gingivalis* WT suplementados com cininogênio humano de alto peso molecular (10  $\mu$ g/animal). Dez dias depois os animais receberam reforço com fimbria (1  $\mu$ g/animal). Os linfonodos submandibulares foram retirados sete dias após o reforço, e foram estimulados com fimbria (100 ng/mL) por 72 hs a 37°C. Os sobrenadantes foram recolhidos e por ELISA foi avaliada a síntese de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T fimbria-específicos. Os resultados são representativos de dois resultados independentes, com resultados similares (n=3 ou 4, por grupo). As diferenças foram analisadas por ANOVA e as comparações par a par foram feitas pelo teste de Tukey (\* e \*\*, p<0,05).

### **4.3 LPS e gingipaína purificados reproduzem o fenótipo inflamatório da bactéria *P. gingivalis*, induzindo a produção de IL-17 e IFN- $\gamma$ de forma dependente do eixo cininas/B<sub>2</sub>R**

De acordo com os resultados já mostrados, sabemos que LPS de *P. gingivalis* é capaz de ativar o eixo TLR2/B<sub>2</sub>R, promovendo edema e conseqüentemente acúmulo de cininas no espaço intersticial gengival, desta forma contribuindo com a montagem de uma resposta adaptativa Th1/Th17. Entretanto não sabemos se o LPS bacteriano e a gingipaína, por si só são capazes de simular o fenótipo bacteriano. Para avaliarmos esta possibilidade nós imunizamos intrabucalmente camundongos BALB/c com uma mistura de OVA/alum juntamente com LPS e gingipaína R, ou OVA/alum, LPS, gingipaína R mais o inibidor de gingipaína, por 20 min. A gingipaína foi pré-ativada com cisteína por 15 min. Um grupo foi pré-tratado com HOE-140 uma hora antes da imunização. Dez dias depois os camundongos receberam um reforço com OVA e sete dias após o reforço os animais foram sacrificados e seus linfócitos T foram retirados dos linfonodos submandibulares. Esses linfócitos foram estimulados *in vitro* com OVA e cultivados a 37°C por 72 h. Os sobrenadantes foram recolhidos e por ELISA foi avaliada a síntese de IL-17 e IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T fimbria-específicos.

Os resultados mostram que (Figuras 8A e 8B) os linfócitos T OVA-específicos dos animais imunizados com OVA/LPS/gingipaína R tiveram alta produção de IL-17 e IFN- $\gamma$ , o que foi reduzida com o pré-tratamento com HOE-140 e na presença do inibidor da gingipaína R. Esses dados indicam que o LPS e a gingipaína, respectivamente agindo como ligante de TLR2 e protease liberadora de cininas são capazes, por si só, de recapitular o fenótipo pró-inflamatório da *P. gingivalis* permitindo a montagem de uma resposta imune adaptativa específica contra OVA.



**Figura 8:** LPS e gingipaína purificados reproduzem o fenótipo inflamatório da bactéria *P. gingivalis*, induzindo a produção de IL-17 e IFN- $\gamma$  de forma dependente do eixo cininas/B<sub>2</sub>R. Camundongos BALB/c foram imunizados intrabucalmente com OVA Ag (25  $\mu$ g/animal) preadsorvido a alum, com suplementação com LPS (7,5 ng/animal) ou gingipaína (RgpB) (10 nM) pré ativada com cisteína. Grupos separados foram tratados com HOE-140 (100  $\mu$ g/kg) (s.c), 1 h antes da imunização. Dez dias depois, os camundongos receberam reforço de OVA (10  $\mu$ g/animal). Os linfonodos submandibulares foram retirados sete dias após o reforço, e foram estimulados com OVA (1  $\mu$ g/animal) por 72 hs a 37°C. Os sobrenadantes foram recolhidos e por ELISA foi avaliada a síntese de IL-17 (A) e IFN- $\gamma$  (B). Os resultados são representativos de dois resultados independentes, com resultados similares (n=5, por grupo). As diferenças foram analisadas por ANOVA e as comparações par a par foram feitas pelo teste de Tukey (\*, p< 0,01).

#### 4.4 Depleção de PMN resulta na incapacidade dos linfócitos T fimbria-específica de animais infectados por *P. gingivalis* de montar uma resposta tipo Th1/Th17

Sabe-se que o acúmulo de neutrófilos no sítio de infecção é essencial para que haja extravasamento de plasma e formação de edema (Schmitz *et al.*, 2009). Sabemos também, que o processo inflamatório, iniciado pela ativação do eixo TLR2/B<sub>2</sub>R, é indispensável para a montagem da resposta adaptativa T, específica contra o antígeno fimbria. Desta forma, podemos inferir que ativação do eixo TLR2/neutrófilos, é um passo limitante controlando a liberação de cininas (sinais de perigo), pela gingipaína, nos tecidos de mucosa.

Para avaliar esta hipótese depletamos PMN de camundongos BALB/c, 18 h antes da infecção, com um anticorpo anti-PMN e como grupo controle tratamos os animais somente com soro normal de coelho. Infectamos os animais intrabucalmente com 10<sup>4</sup> *P. gingivalis* WT ou com ΔRgps. Uma hora antes um grupo foi pré-tratado com HOE-140. Os grupos de animais depletados de PMN e infectados com *P. gingivalis* WT, ou WT/HOE-140 ou ainda ΔRgps, receberam HK, junto com a injeção de bactéria, como fonte externa de substrato para gingipaína. Dez dias depois os camundongos receberam um reforço com o antígeno fimbria e sete dias após o reforço os animais foram sacrificados e seus linfócitos T foram retirados dos linfonodos submandibulares. Esses linfócitos foram estimulados *in vitro* com fimbria e cultivados a 37°C por 72 h. Os sobrenadantes foram recolhidos e por ELISA foi avaliada a síntese de IL-17 e IFN-γ pelos linfócitos T fimbria-específicos.

Podemos observar (Figuras 9A e 9B) que o grupo de animais que não sofreu depleção de PMN e foi infectado com a bactéria WT apresentou aumento na síntese de IL-17 e IFN-γ, pelos linfócitos T fimbria-específicos, quando comparado aos animais não depletados de PMN e não infectados. Contudo, os animais não depletados de PMN, mas pré-tratados com HOE-140 ou infectados com a bactéria ΔRgps apresentaram produção de IFN-γ e IL-17, pelos

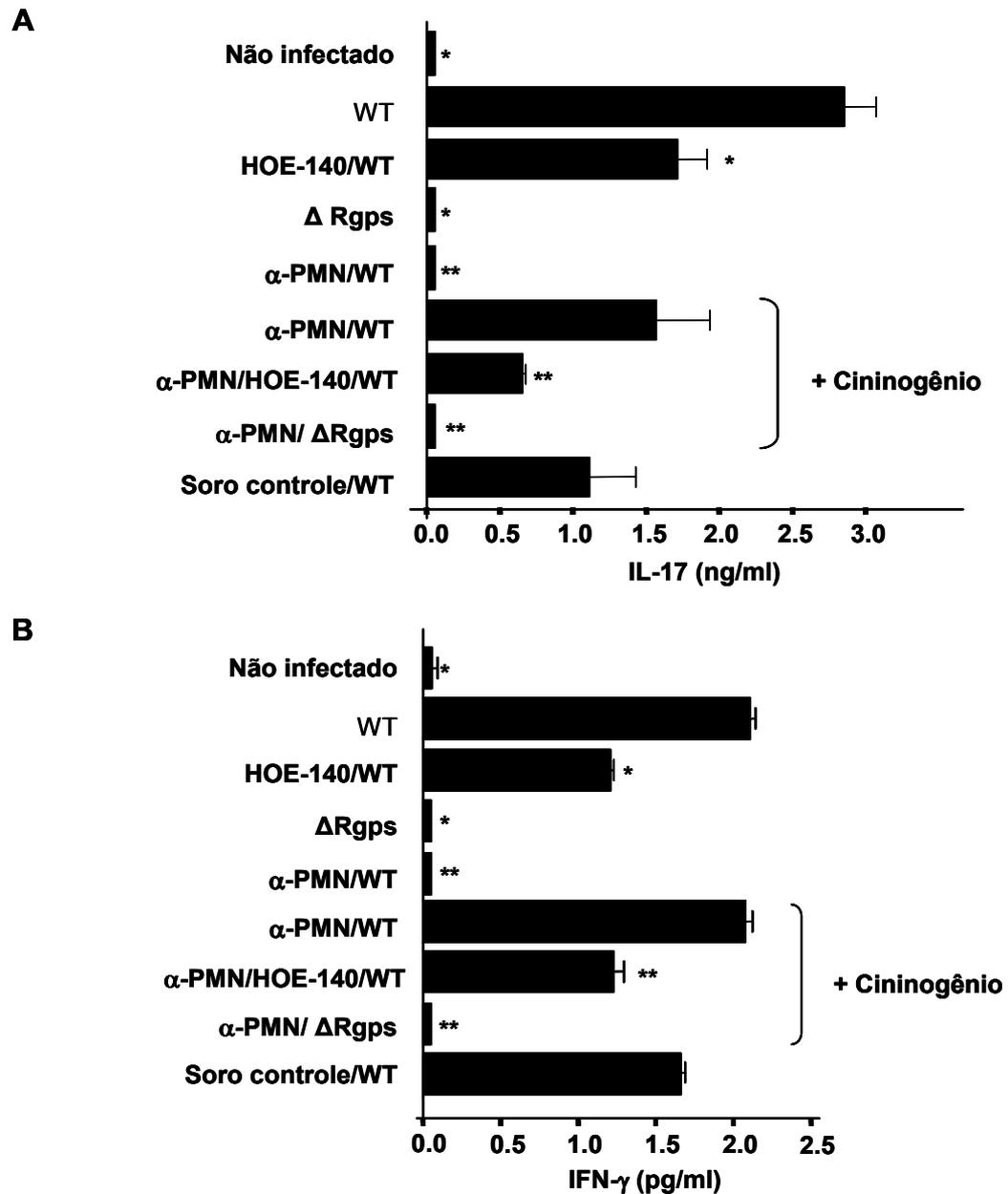
linfócitos T fimbria-específicos, reduzida significativamente. Igualmente o grupo depletado de PMN e infectado com a bactéria WT apresentou produção reduzida destas citocinas. Todavia, quando adicionamos HK exógeno observamos o aumento na produção de IL-17 e IFN- $\gamma$  nos grupos de animais infectados com a bactéria WT, mas não nos grupos tratados com HOE-140 ou infectados com a bactéria  $\Delta$ Rgps. No grupo controle do experimento tratamos um grupo de animais com soro normal de coelho, mostrando que o anticorpo anti-PMN era específico. Entretanto os grupos pré-tratados com soro normal de coelho apresentaram produção de IL-17 e IFN- $\gamma$ , pelos linfócitos T fimbria-específicos, reduzidas em comparação aos animais somente infectados com a bactéria WT.

Nosso grupo demonstrou que a migração de neutrófilos, durante infecção com o *T. cruzi*, é dependente da produção de quimiocinas KC e MIP-2, por macrófagos, e o reconhecimento destas pelo receptor CXCR2 em PMN (Haffajee e Socransky, 1994). Assim, utilizando o modelo animal, *hamster cheek pouch* (HCP), onde podemos observar o extravasamento de plasma na bochecha do hamster, em min, avaliamos o papel deste receptor durante a infecção com a *P. gingivalis*.

Infectamos o hamster com  $10^4$  bactérias WT (Figura 10A). Pudemos observar que a bactéria induz extravasamento de plasma. Adicionamos o antagonista do receptor CXCR2, repertaxina, 45 min após a infecção e quinze min depois reinfetamos o animal com  $10^4$  bactérias WT. Houve uma redução de cerca de 4 vezes no extravasamento de plasma, entre a primeira e a segunda infecção, indicando a importância deste receptor no processo de extravasamento de plasma. Para termos certeza de que a redução observada após o tratamento com a repertaxina foi realmente decorrente do bloqueio de CXCR2 e não de uma exaustão provocada pela alta resposta da primeira infecção, nós tratamos o hamster com repertaxina min antes de infectá-lo com  $10^4$  bactérias WT (Figura 10B). Vimos que o extravasamento de plasma foi inibido mesmo após uma reinfecção deste animal com a bactéria WT,

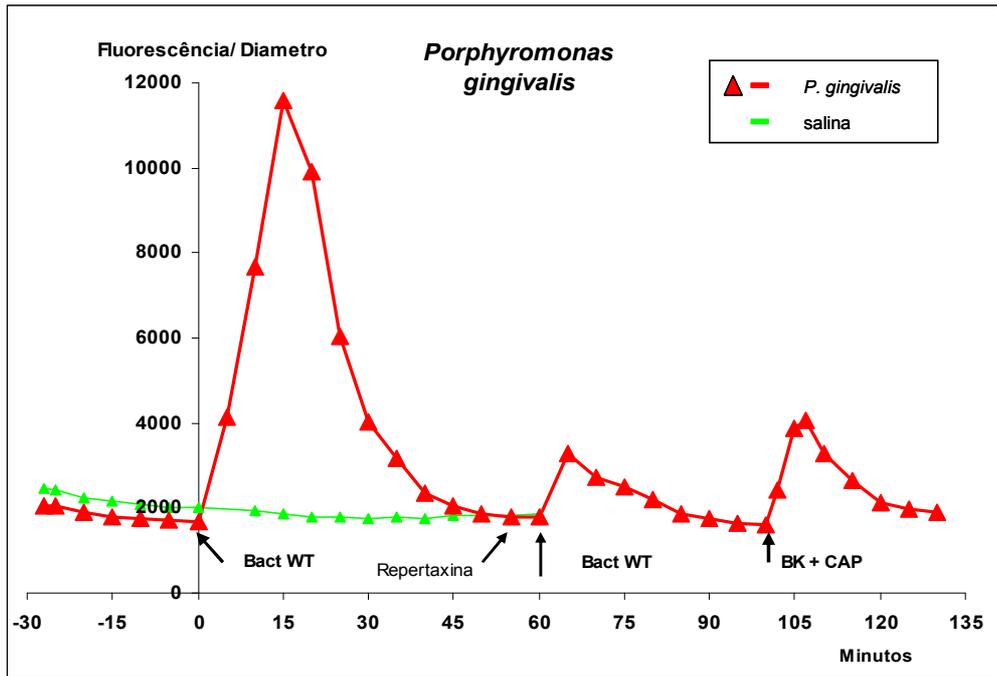
aproximadamente 45 min após a primeira infecção. Em contrapartida, pudemos observar um significativo extravasamento de plasma quando, 3 h após o tratamento com a repertaxina, foi administrada bradicinina mais captopril (inibidor da enzima ECA), provando que não houve exaustão do sistema.

Esses experimentos indicam que a administração de HK exógeno (substrato para gingipaína) nos sítios periféricos de infecção transpõe o requerimento do influxo de plasma dependente da via TLR2/PMN. Além disso, estes resultados sugerem que a ativação do endotélio e/ou neutrófilos pela via KC/MIP-2>CXCR2 pode fazer a ponte entre o reconhecimento inato de *P. gingivalis* (através de TLR2) por células sentinelas do sistema imune inato com um dos sistemas proteolíticos (cinina) responsáveis pela amplificação da resposta inflamatória induzida pela bactéria.

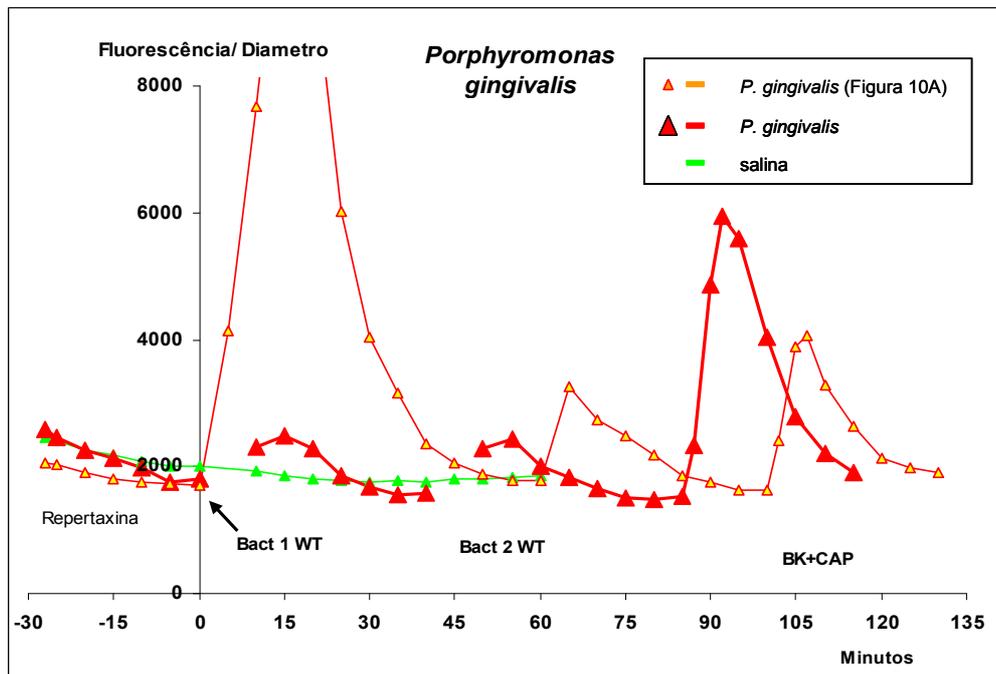


**Figura 9: Depleção de PMN resulta na incapacidade dos linfócitos T fimbria-específica de animais infectados por *P. gingivalis* de montar uma resposta tipo Th1/Th17.** Camundongos BALB/c foram depletados de PMN 18 hs antes da infecção, com um anticorpo anti-PMN (0,45 ml i.p de uma diluição 1:10) e como grupo controle tratamos os animais somente com soro normal de coelho. Infectamos os animais intrabucalmente com 10<sup>4</sup> *P. gingivalis* WT ou com ΔRgps. Uma h antes um grupo foi pré-tratado com HOE-140 (100 μg/kg) (s.c). Os grupos de animais depletados de PMN e infectados com *P. gingivalis* WT, ou WT/HOE-140 ou ainda ΔRgps, receberam, junto com a injeção de bactéria, cininogênio humano de alto peso molecular (10 μg/animal), como fonte externa de substrato para gingipaina. Dez dias depois os camundongos receberam um reforço com o antígeno fimbria (1μg/animal) e sete dias após o reforço os animais foram sacrificados e seus linfócitos T foram retirados dos linfonodos submandibulares. Esses linfócitos foram estimulados *in vitro* com fimbria (100 ng/mL) e cultivados a 37°C por 72 hs. Os sobrenadantes foram recolhidos e por ELISA foi avaliada a síntese de IL-17 (A) e IFN-γ (B) pelos linfócitos T fimbria-específicos. Os resultados são representativos de dois resultados independentes, com resultados similares (n=4, por grupo). As diferenças foram analisadas por ANOVA e as comparações par a par foram feitas pelo teste de Tukey (\* e \*\*, p< 0,01).

A



B



**Figura 10: Análise por microscopia intravital do efeito da repertaxina (antagonista do CXCR2) no extravasamento de plasma induzido pela *P. gingivalis*.** (A) Infectamos o hamster com  $10^4$  bactérias WT. Após aproximadamente 45 min da infecção, nós adicionamos o antagonista do receptor CXCR2, a repertaxina e 15 min após reinfetamos o animal com  $10^4$  bactérias WT. (B) Tratamos o hamster com a repertaxina 15 min antes de infectá-lo com  $10^4$  bactérias WT. Após 30 min da primeira infecção reinfetamos o animal com o mesmo número de bactérias. No final dos experimentos demos BK (520nM)+CAP (1 $\mu$ M) para avaliarmos se não houve exaustão do sistema microvascular.

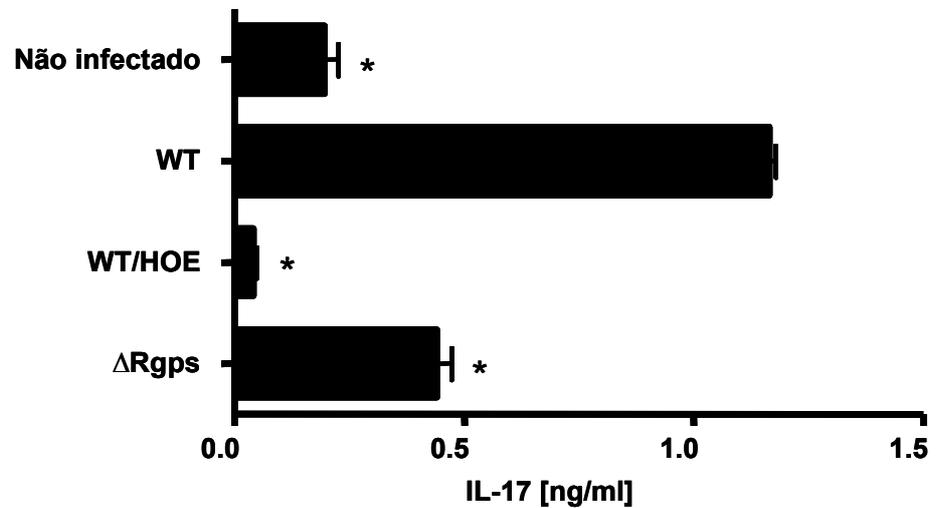
#### **4.5 O Perfil funcional de linfócitos T fimbria-específicos isolados do linfonodo submandibular de camundongos BALB/c após re-injecção com $10^7$ *P. gingivalis***

Portadores de doença periodontal estão constantemente sendo reinfectedados pelas bactérias contidas em reservatórios nas cavidades orais e nas placas bacterianas (Henderson *et al.*, 1994). Desta forma, imaginamos que este processo de reinfecção possa de alguma forma modular a resposta imunológica a este patógeno, contribuindo ou não para o estágio da doença e para o controle da carga bacteriana.

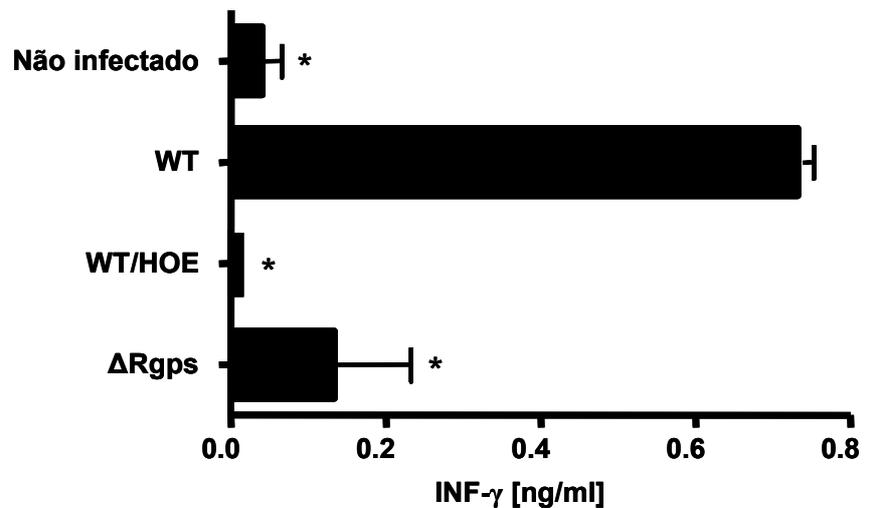
Para responder esta pergunta infectamos camundongos BALB/c inicialmente com  $10^4$  bactérias WT ou  $\Delta$ Rgps e ao invés de darmos um reforço com fimbria no décimo dia, nós reinfectedamos estes camundongos, no décimo sétimo dia, com  $10^7$  bactérias WT. Um grupo foi tratado com HOE-140 uma hora antes da primeira infecção e a dose do antagonista, ao longo do experimento, não foi repetida. Dois dias após a reinfecção os animais foram sacrificados e seus linfócitos T foram retirados dos linfonodos submandibulares. Esses linfócitos foram estimulados *in vitro* com fimbria e cultivados a 37°C por 72 h. Os sobrenadantes foram recolhidos e por ELISA foi avaliada a síntese de IL-17 e IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T fimbria-específicos.

Pudemos observar que a reinfecção dos animais não causou nenhuma mudança no padrão de resposta imunológica quando comparado aos experimentos de infecção única. Notamos novamente que a administração de HOE-140 e a infecção com a bactéria  $\Delta$ Rgps causaram redução na produção das citocinas IL-17 e IFN- $\gamma$ , pelos linfócitos T fimbria-específicos (Figuras 11A e 11B). Logo, podemos dizer que neste modelo de infecção uma reexposição ao patógeno não acarreta uma mudança no padrão de citocinas.

A



B



**Figura 11: O Perfil funcional de linfócitos T fimbria-específicos isolados do linfonodo submandibular de camundongos BALB/c após re-injecção com  $10^7$  *P. gingivalis*.** Camundongos BALB/c foram pré-tratados ou não com HOE-140 (100  $\mu$ g/kg) (s.c), 1 h antes da infecção intrabucal com  $10^4$  *P. gingivalis* WT ou com a bactéria  $\Delta$ Rgps. Dezesete dias depois os animais foram reinfetados com  $10^7$  *P. gingivalis* WT. Os linfonodos submandibulares foram retirados dois dias depois após a reinfecção, e foram estimulados com fimbria (100 ng/mL) por 72 hs a 37°C antes dos valores de IL-17 (A) e IFN- $\gamma$  (B) serem determinados por ELISA. Os resultados são representativos de um resultado (n=5, por grupo). As diferenças foram analisadas por ANOVA e as comparações par a par foram feitas pelo teste de Tukey (\*, p < 0,001).

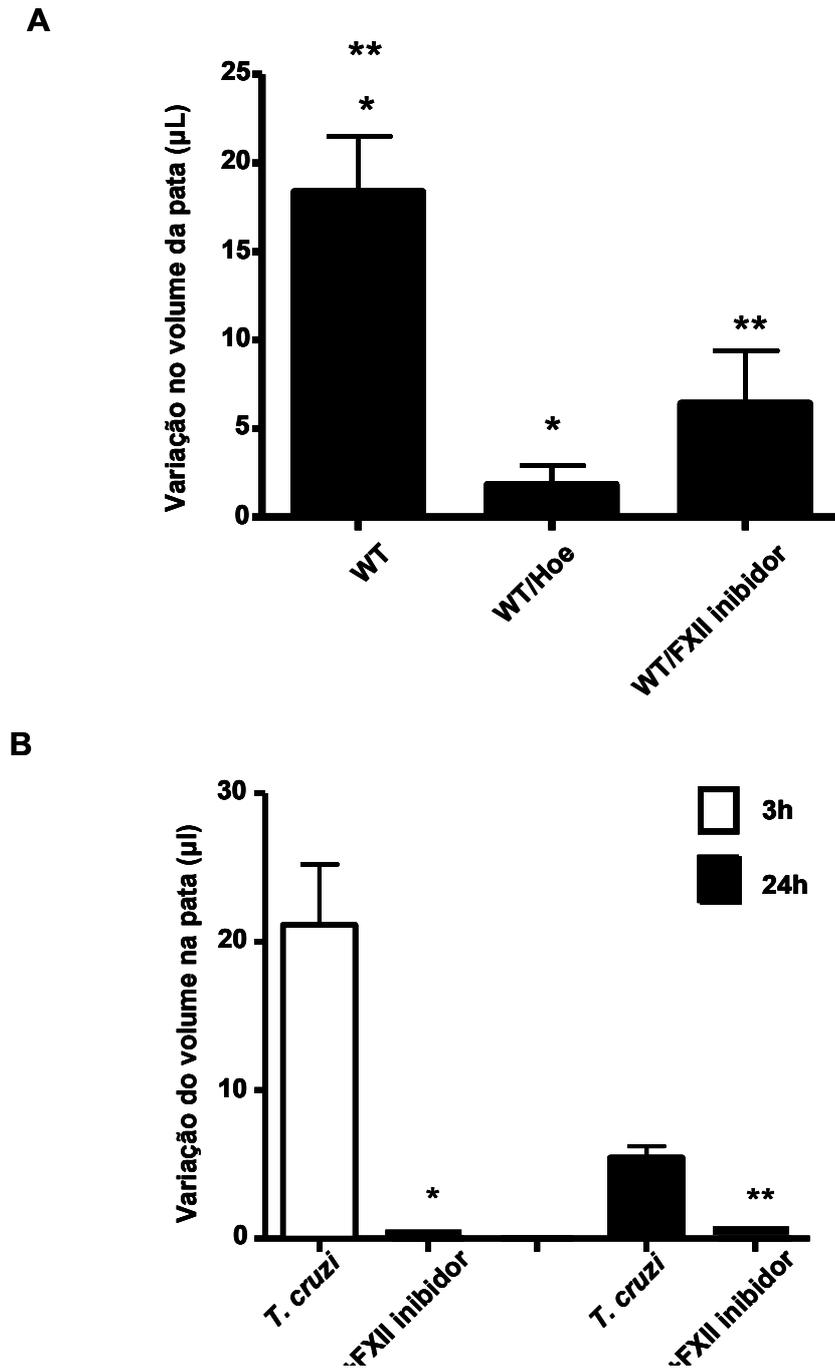
#### **4.6 Ativação do sistema de contato é essencial para que haja resposta edematogênica e para a montagem da resposta anti-Fim Th1 e Th17**

A ativação do sistema de contato pode ocorrer em superfícies celulares. Sabe-se que neutrófilos possuem moléculas de cininogênio, FXII, FXI e pré-caliceína em suas membranas onde pode ocorrer ativação do sistema de contato e a geração de cininas (Haffajee e Socransky, 1994). Desta forma, é possível que a ativação deste sistema, possivelmente na superfície de células sentinelas, seja importante para o processo inicial de inflamação deflagrada pela *P. gingivalis*, via o eixo TLR2/B<sub>2</sub>R, contribuindo para a montagem da resposta adaptativa T fimbria-específica.

Para avaliarmos esta premissa, nós infectamos camundongos BALB/c na pata com 10<sup>4</sup> bactérias WT ou 2x10<sup>6</sup> *T. cruzi* (tripomastigotas). Uma hora antes da infecção, um grupo recebeu HOE-140 e outro grupo recebeu o inibidor do FXII (0,5mg/animal) i.v. Analisamos as respostas edematogênicas 3 h (bactéria e parasita) e 24 h (parasita) após a infecção. Para a bactéria *P. gingivalis*, foi feita análise da resposta adaptativa T fimbria-específica, logo dez dias depois os camundongos receberam um reforço com o antígeno fimbria e sete dias após o reforço os animais foram sacrificados e seus linfócitos T foram retirados dos linfonodos poplíteo. Esses linfócitos foram estimulados *in vitro* com fimbria e cultivados a 37°C por 72 h. Os sobrenadantes foram recolhidos e por ELISA foi avaliada a síntese de IL-17 e IFN-γ pelos linfócitos T fimbria-específicos.

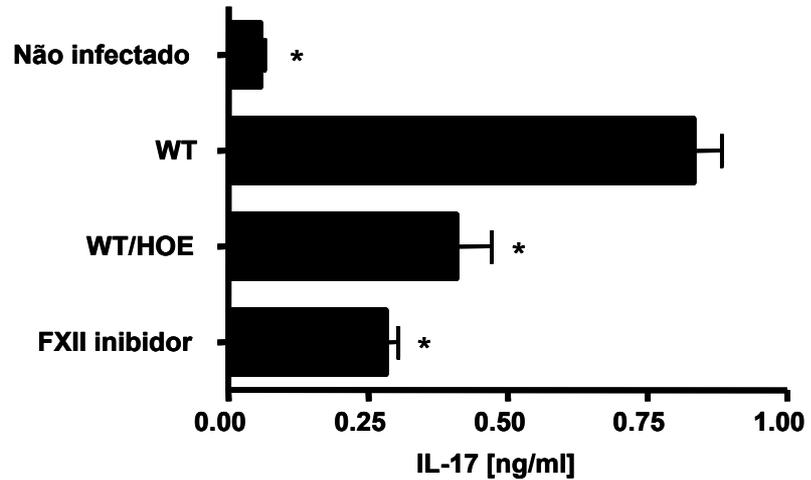
A escolha de realizarmos experimentos em paralelo com outro patógeno, no caso o protozoário *T. cruzi*, teve como objetivo comparar as respostas edematogênicas deflagradas por organismos tão distintos, principalmente em relação à importância da ativação do sistema de contato.

Os resultados nos mostram que tanto a bactéria quanto o tripomastigota são capazes de provocar edema na pata dos animais, e o tratamento com HOE-140 ou com o inibidor do FXII (Figuras 12A e 12B) reduzem a formação de edema. Observamos que a infecção pela bactéria induziu a síntese de IL-17 e INF- $\gamma$  pelos linfócitos T fimbria-específicos, o que foi reduzida pelo pré-tratamento com HOE-140 ou com inibidor do FXII (Figuras 13A e 13B). Estes resultados sugerem que a ativação do sistema de contato é necessária para a formação de edema intersticial, em última análise favorecendo a indução da resposta anti-Fim Th1 e Th17.

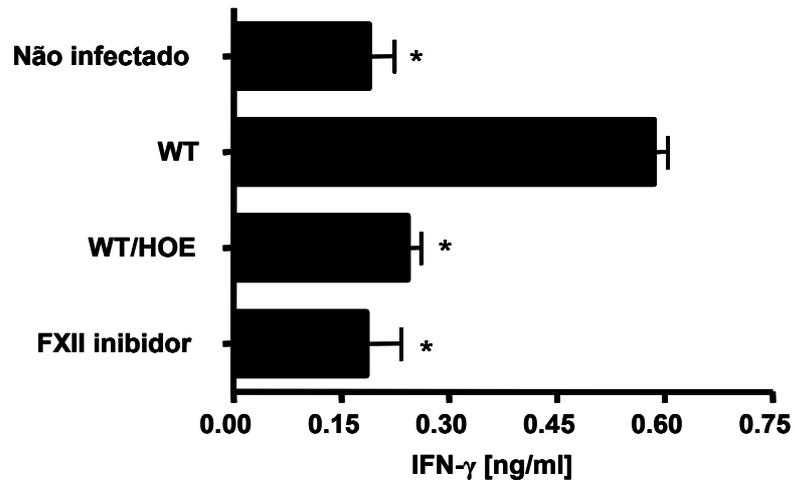


**Figura 12: Ativação do sistema de contato é essencial para que haja resposta edematogênica.** Camundongos BALB/c foram pré-tratados ou não com HOE-140 (100 µg/kg) (s.c) e inibidor do FXII (0,5 mg/animal) (i.v), 1 h antes da infecção na pata com  $10^4$  *P. gingivalis* WT (A) ou  $2 \times 10^6$  *T. cruzi* (B). 3 hs e 24 hs após a infecção a formação do edema foi avaliada. Os resultados são representativos de um resultado (n=5, por grupo). As diferenças foram analisadas por ANOVA e as comparações par a par foram feitas pelo teste de Tukey (\*,  $p < 0,01$ ; \*\*,  $p < 0,05$ ).

A



B



**Figura 13: Ativação do sistema de contato é essencial para a montagem da resposta anti-Fim Th1 e Th17.** Camundongos BALB/c foram pré-tratados ou não com HOE-140 (100 µg/kg) (s.c) e inibidor do FXII (0,5 mg/animal) (i.v), 1 h antes da infecção na pata com 104 *P. gingivalis* WT. Os linfonodos submandibulares foram retirados sete dias depois após o reforço, e foram estimulados com fimbria (100 ng/mL) por 72 hs a 37°C antes dos valores de IL-17 (A) e IFN-γ (B) serem determinados por ELISA. Os resultados são representativos de um resultado (n=5, por grupo). As diferenças foram analisadas por ANOVA e as comparações par a par foram feitas pelo teste de Tukey (\*, p<0,001).

## 5 Discussão

*Porphyromonas gingivalis* é uma das bactérias gram negativas que contribuem para o desenvolvimento da doença periodontal (Socransky *et al.*, 1998). Sabemos que a periodontite é causada por um processo inflamatório crônico promovido pelo biofilme depositado nos tecidos gengivais (Colombo *et al.*, 2006). Como consequência deste processo inflamatório ocorre desgaste dos tecidos de sustentação do dente, como o tecido ósseo alveolar, ocasionando a perda do dente (Holt e Bramanti, 1991).

Freqüentemente presente na microbiota que forma o biofilme, a bactéria *P. gingivalis* pode contribuir para o processo inflamatório crônico. Entre os fatores de virulência, que possuem atividade pró-inflamatória (Chiang *et al.*, 1999; Kadowaki *et al.*, 2000; Asai *et al.*, 2001), destacam-se o LPS, a fimbria e as proteases gingipaínas (Yoshimura *et al.*, 2002)

Dados do grupo, obtidos na primeira etapa desta pesquisa, mostraram que a *P. gingivalis* é capaz de induzir inflamação tanto quando injetadas na pata quanto quando injetadas intrabucalmente no vestibulo anterior, através de mecanismos de ativação dependentes de TLR2/B<sub>2</sub>R, uma via do sistema imune inato deflagrada pela cooperação de diferentes sinais de perigo: o LPS de *P. gingivalis*, um ligante atípico de TLR2 (Imamura *et al.*, 1995) e a bradicinina, um peptídeo pró-inflamatório endógeno liberado do cininogênio pela cisteíno protease bacteriana, gingipaína (Monteiro *et al.*, 2006).

Tal como demonstrado no modelo de infecção chagásica (Monteiro *et al.*, 2009), no presente trabalho observamos que a geração de cininas no espaço intersticial gengival/subgengival requer acúmulo de proteínas plasmáticas (inclusive de cininogênios). Foi demonstrado que o aporte de plasma para o interstício é por sua vez precedido pela ativação de TLR2 pelo LPS. Animais deficientes em TLR2, ou deficientes em B<sub>2</sub>R, ou depletados de PMN ou animais WT infectados com a bactéria deficiente para as gingipaínas

R, não desenvolvem a gengivite (Noiri *et al.*, 2004). Neste trabalho demonstramos que o perfil funcional de linfócitos T específicos para o antígeno fimbria, nos animais infectados intrabucalmente pela *P. gingivalis*, é coordenado pelo eixo TLR2/B<sub>2</sub>R.

Apesar de sabermos que outros antígenos bacterianos podem contribuir com a totalidade de linfócitos T efetores anti-*P. gingivalis*, nós decidimos utilizar a fimbria bacteriana como antígeno nos experimentos de recrutamento de linfócitos T, pois as linhagens de *P. gingivalis* mais encontradas nos sulcos gengivais de pacientes com periodontite severa são aquelas que possuem fimbria, mais do que as linhagens que não a possuem (Darveau *et al.*, 2004).

Os experimentos utilizando camundongos BALB/c mostram, que a injeção intrabucal de uma quantidade pequena de bactéria,  $10^4$  por animal é suficiente para induzir uma resposta tipo Th1/Th17, em resposta a fimbria. Nestes experimentos pudemos observar que a indução de linfócitos T produtores de IFN- $\gamma$  e IL-17 nos animais BALB/c é dependente da geração de bradicinina e da ativação de seu receptor B<sub>2</sub>, uma vez que ao tratarmos os animais com HOE-140, a produção destas citocinas, pelos linfócitos T fimbria-específicos, foi praticamente abolida. Nossos estudos indicam que a geração de cininas é dependente da atividade enzimática da gingipaína, visto que a resposta Th1/Th17 foi abolida quando infectamos os animais BALB/c com a bactéria tratada com um inibidor irreversível da gingipaína, D-Phe-Pro-Arg-chloromethyl ketone, ou com a bactéria deficiente ( $\Delta$ Rgps) para a mesma (Figuras 6A e 6B).

Com o objetivo de avaliar a importância do eixo TLR2/B<sub>2</sub>R na montagem da resposta imune adaptativa fimbria-específica, nós infectamos camundongos C57BL/6 (selvagens) e TLR2<sup>-/-</sup> tanto com a bactéria WT quanto com  $\Delta$ Rgps (Figura 7). Nós observamos que os linfócitos isolados do linfonodo submandibular dos camundongos selvagens produzem IFN- $\gamma$ . Entretanto a resposta adaptativa foi bloqueada pelo tratamento com HOE-140 e pela infecção

com a bactéria WT tratada com inibidor da gingipaína ou com a bactéria  $\Delta Rgps$ . Os linfócitos T isolados de animais TLR2<sup>-/-</sup> não foram capazes de produzir IFN- $\gamma$ . Todavia os animais TLR2<sup>-/-</sup>, infectados com a bactéria WT juntamente com HK (cininogênio humano de alto peso molecular), recuperaram sua capacidade de induzir respostas anti-fimbria produtoras de IFN- $\gamma$ , pela via B<sub>2</sub>R dependente. Essa experiência indica que o eixo TLR2/B<sub>2</sub>R é essencial para a montagem da resposta adaptativa fimbria-específica. Quando damos cininogênio exógeno aos camundongos deficientes para TLR2, estamos transpondo a necessidade de que haja extravasamento de plasma, dando ao sistema o substrato para a gingipaína, por isso as células T desses animais produzem IFN- $\gamma$  mesmo na ausência deste receptor.

Admitindo que existam controvérsias sobre os requerimentos estruturais para que o LPS de *P. gingivalis* se ligue a TLR2 ou TLR4 (Brigl *et al.*, 2003), estudos utilizando camundongos deficiente para TLR4, no modelo de infecção na mucosa oral, devem ser realizados para desvendar se nestes casos o LPS é capaz de induzir a produção de IFN- $\gamma$ , pelas células T específicas para fimbria, de uma maneira gingipaína/B<sub>2</sub>R dependente, como descrito para a via TLR2.

Como dito anteriormente, a ativação do eixo TLR2/B<sub>2</sub>R pela *P. gingivalis* pode ser consequência da ativação de células sentinelas do sistema imune pelo LPS bacteriano, promovendo edema e consequentemente favorecendo o acúmulo de cininogênio nos espaços intersticiais gengivais. Dentre as células sentinelas que poderiam reconhecer o LPS bacteriano podemos citar as células NKT (Mrabet-Dahbi *et al.*, 2009), os mastócitos (Roberts *et al.*, 1997) e macrófagos (Brigl *et al.*, 2003). As células NKT respondem rapidamente a antígenos lipídicos, como o LPS (Bendelac *et al.*, 1997; Brigl e Brenner, 2004), apresentados pela molécula especializada em apresentação de antígenos lipídicos, CD1d, sendo capazes de secretar citocinas do tipo Th1 (IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4) e Th17 (IL-17) (Chiba *et al.*, 2008). As

células NKT participam na defesa contra várias infecções virais, bacterianas e de protozoários (Monteiro *et al.*, 2009).

Para determinar se o LPS e gingipaína são capazes de simular o fenótipo bacteriano, nós imunizamos os animais (BALB/c) com uma mistura de OVA/alum mais as moléculas LPS e gingipaína R purificadas, e analisamos a resposta adaptativa T específica contra OVA. Observamos que os linfócitos T OVA-específicos dos animais imunizados com OVA/alum, LPS e gingipaína R respondem ao estímulo *in vitro* com OVA, produzindo IL-17 (Figura 8A) e IFN- $\gamma$  (Figura 8B). Contudo, este efeito foi abolido quando os animais foram pré-tratados com HOE-140 ou quando a gingipaína R foi inativada pelo seu inibidor.

Dados histológicos, obtidos na primeira etapa do trabalho, mostraram que animais B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> ou TLR2<sup>-/-</sup> não apresentaram infiltrados de PMN no sítio de infecção, 48 h após a infecção com *P. gingivalis*, quando comparados com os animais selvagens. Da mesma forma, animais depletados de PMN ou animais B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> ou TLR2<sup>-/-</sup>, não desenvolvem gengivite, 3 h após a infecção intrabucal com *P. gingivalis*. Esses dados indicam que a ativação do eixo TLR2/B<sub>2</sub>R é essencial para a migração de neutrófilos para o sítio de infecção, sendo a presença deste imprescindível para que haja extravasamento de plasma e formação da gengivite (Schmitz *et al.*, 2009). Em outras palavras, podemos inferir que a reação vascular orquestrada pela bactéria depende de TLR2, e que induz migração de neutrófilos, sendo um passo limitante controlando a liberação de cininas (sinais de perigo), pela gingipaína, nos tecidos de mucosa.

Faltava determinar o papel da ativação de neutrófilos para a montagem da resposta adaptativa anti-fimbria. Para isto, depletamos PMN de camundongos BALB/c, utilizando anticorpos anti-PMN. Observamos que os linfócitos T fimbria-específicos dos animais depletados foram incapazes de produzir IFN- $\gamma$  e IL-17 (Figura 9A e 9B). Somente quando infectamos os animais depletados de PMN com a bactéria WT, suplementada de HK exógeno,

observamos que os linfócitos T fimbria-específicos destes animais tornaram-se outra vez capazes de secretar estas citocinas, mesmo na ausência de PMN. Em contraste o pré-tratamento com HOE-140 ou a infecção com a bactéria  $\Delta$ Rgps, aboliu o efeito do resgate da resposta adaptativa resultante da adição de HK.

Esses resultados mostram que a ativação do eixo TLR2/neutrófilos é um evento importante para a montagem das respostas Th1/Th17. Corroborando estes resultados, mostramos também, no modelo de *hamster cheek pouch*, que ao utilizarmos a repertaxina, um antagonista do receptor CXCR2, presente nos PMN, há redução no extravasamento de plasma mediado pela *P. gingivalis* WT (Figuras 10A e 10B). Dados anteriores do grupo, no modelo de infecção com *T. cruzi* mostraram que a inibição de CXCR2 pela repertaxina causa redução no acúmulo de neutrófilos no sítio de infecção e redução do extravasamento de plasma (Aliberti *et al.*, 2003; Monteiro *et al.*, 2006; Monteiro *et al.*, 2007).

Nossos resultados mostram que as células T fimbria-específicas de camundongos BALB/c infectados inicialmente com  $10^4$  bactérias, mantém o perfil de citocinas quando submetidas à reinfecção com uma dose 1000 vezes maior ( $10^7$ ) (Figuras 11A e 11B). Entretanto, até o momento não sabemos se os padrões diferenciados de resposta T fimbria-específica, entre os diferentes grupos de animais, tem impacto sobre a carga bacteriana dos mesmos.

Outra questão ainda não resolvida é a identidade das células apresentadoras capazes de sentir os sinais de cininas liberados pela gingipaína. Diferentemente dos trabalhos no modelo de *T. cruzi* (Cutler e Jotwani, 2006; Le Borgne *et al.*, 2006; Cutler e Teng, 2007), não determinamos se a indução de citocinas Th1 *versus* Th17 refletem diferenças na expressão de B<sub>2</sub>R em células dendríticas (CD 11c<sup>+</sup>) residentes ou recrutadas para a área de mucosa inflamada, nem se há o envolvimento de subtipos especializados de células dendríticas, como as células de Langherans e as células intersticiais dermais (Stark *et al.*, 2005).

Experiências adicionais são necessárias para determinarmos se as células apresentadoras são capazes de endocitar a bactéria diretamente do ambiente, ou se endocitam neutrófilos apoptóticos que já fagocitaram a bactéria (Stark *et al.*, 2005). Neste contexto, vale mencionar um trabalho recente mostrando que a produção de IL-23 por células apresentadoras é reduzida quando estas células fagocitam neutrófilos apoptóticos, tendo com consequência a redução de IL-17 e G-CSF, em última análise controlando a granulopoiese (Aliberti *et al.*, 2003; Skidgel e Erdos, 2004; Scharfstein *et al.*, 2008). Cabe ressaltar que os linfócitos anti-fimbria dos animais C57BL6 não produziram IL-17 quando estimulados com Fim *in vitro*. É possível, portanto, que a infecção dos camundongos BALB/c promova uma intensa granulopoiese, devido à produção de IL-17 pelas células T anti-fimbria. Cabe determinar se os neutrófilos dos animais BALB/c e C57BL6 sofrem apoptose ao entrarem nos tecidos intersticiais gengivais e se este fato resulta em fagocitose pelas células apresentadoras. A fagocitose de neutrófilos apoptóticos pelas células apresentadoras promove redução dos níveis de expressão de IL-23, podendo desta forma, explicar a deficiência na diferenciação da resposta Th17 nos animais C57BL6. Além disso, diferenças na expressão de peptidases, que degradam as cininas, como a ECA, podem influenciar na extensão de produção de IL-12 e ou IL-23 pelas células apresentadoras quando estimuladas pelas cininas, explicando desta forma a discrepância no padrão de citocinas entre esses animais (Hosoi *et al.*, 2000).

Além das células dendríticas, podemos supor que outras células sentinelas, ditas como pertencentes ao sistema inato da imunidade, podem também estar envolvidas no reconhecimento e desencadeamento de uma resposta inflamatória dependente de cininas. Dentre elas podemos citar mastócitos, neutrófilos, plaquetas, macrófagos e eosinófilos.

Os mastócitos apresentam cininogênio em sua superfície, além disso, a triptase liberada de seus grânulos é capaz de clivar o cininogênio gerando cininas (Carlos *et al.*, 2009; Mrabet-Dahbi *et al.*, 2009). Eles são capazes de liberar citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-17 quando

estimuladas com ligantes de TLR2 (Greengard e Griffin, 1984; Gustafson *et al.*, 1986; Gustafson *et al.*, 1989; Barbasz *et al.*, 2008).

Os neutrófilos, as plaquetas e os macrófagos também possuem em suas membranas moléculas de cininogênio, além de sítios de ligação para o mesmo (Roberts *et al.*, 1997; Muzio *et al.*, 2000; Cognasse *et al.*, 2005; Aslam *et al.*, 2006), além de receptores do tipo Toll (Bertram *et al.*, 2009). Já os eosinófilos expressam os receptores de bradicinina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (Mawhorter *et al.*, 1994; Shi *et al.*, 2000; Padigel *et al.*, 2006; Akuthota *et al.*, 2008), além de serem capazes de apresentar antígenos (Henderson *et al.*, 1994)

Sabe-se que neutrófilos, além do cininogênio, possuem moléculas de FXII, FXI e pré-caliceína em suas membranas onde pode ocorrer ativação do sistema de contato e a geração de cininas (Abu-Amer *et al.*, 1997). Nós observamos neste trabalho que a ativação do sistema de contato é importante para a iniciação do processo inflamatório. Mostramos que a infecção de camundongos BALB/c pela *P. gingivalis* provoca edema de pata, efeito este abolido mediante pré-tratamento dos animais com o inibidor do FXII (Figuras 12A e 12B). Vale destacar que a montagem da resposta Th1/Th17 foi dependente da ativação do sistema de contato, uma vez que o pré-tratamento dos animais com o inibidor do FXII reduziu a produção de IFN- $\gamma$  e IL-17 pelos linfócitos T específicos para fimbria (Figuras 13A e 13B). Trabalhos em andamento poderão esclarecer de que modo a ativação do sistema de contato contribui para a montagem da resposta adaptativa, investigaremos se a ativação da via de contato ocorre durante a interação entre o endotélio e os PMN contribuindo para o extravasamento de plasma, ou se sua ativação ocorre nos espaços intersticiais gengivais contribuindo com a produção alternativa de bradicinina.

Apesar de vários modelos animais e *in vitro* buscarem o papel de linfócitos T na patogênese da doença periodontal, ainda existe muitas perguntas e muitas controvérsias a este respeito. Sabe-se que o desgaste do tecido ósseo, característico da periodontite, é causado pelo

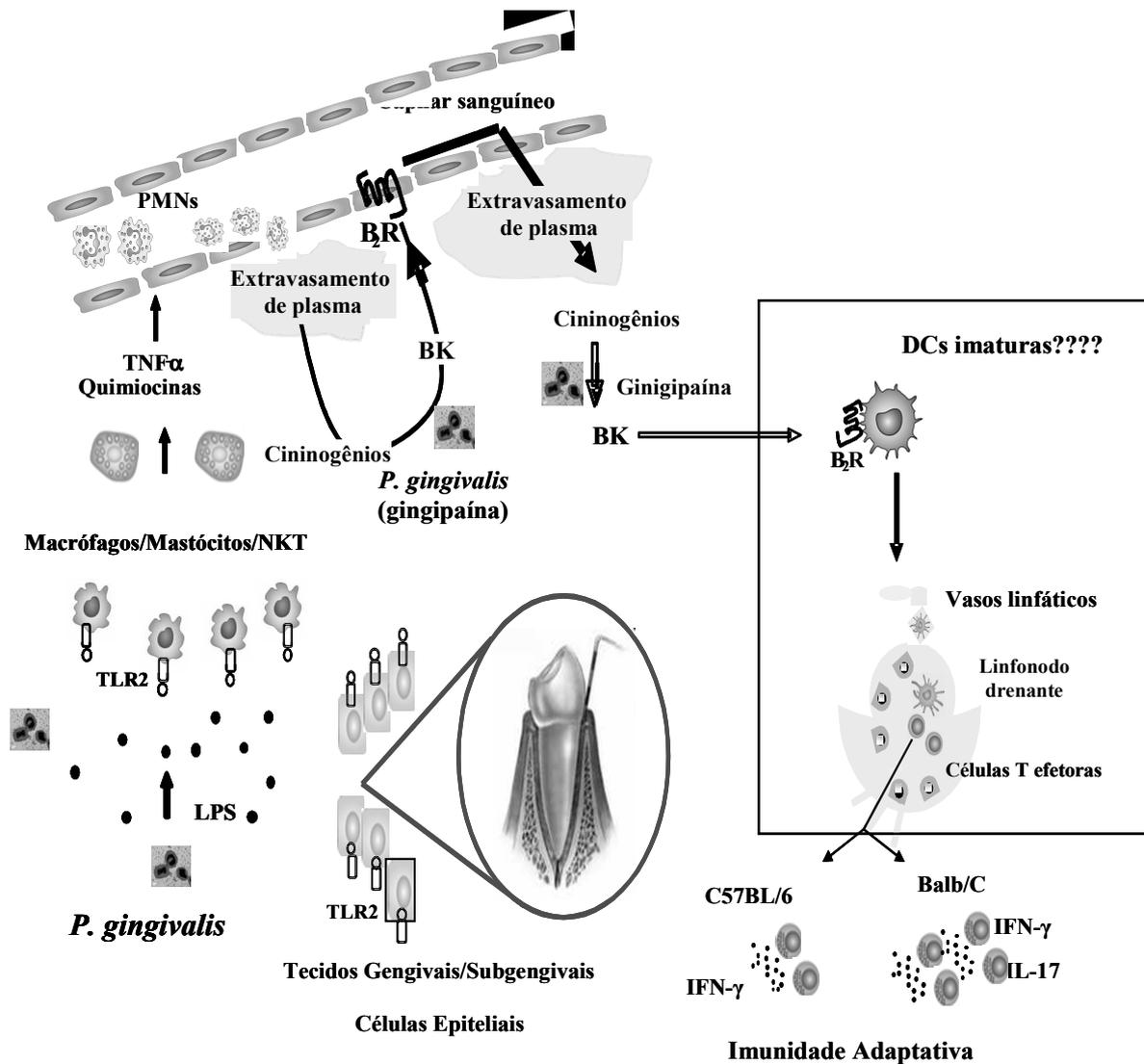
processo de osteoclastogênese, onde células de origem hematopoiética são diferenciadas em osteoclastos (Nakashima *et al.*, 2000; Kesavalu *et al.*, 2002; Gaffen, 2004; Takayanagi, 2005; Stashenko *et al.*, 2007). Existem inúmeros fatores responsáveis por este processo. Algumas citocinas têm sido relacionadas com o aumento da osteoclastogênese, como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17, IFN- $\gamma$  e a molécula RANKL (Burns *et al.*, 2006).

Além destas citocinas, alguns autores mostram que a ativação de TLR2 está relacionada com maior susceptibilidade a perda óssea porque impede que o hospedeiro elimine a bactéria (Hajishengallis *et al.*, 2007). Esses estudos mostram que o estímulo de fimbria via TLR2 em macrófagos, induz uma regulação positiva do receptor CR3, resultando na inibição da síntese de IL-12p70 e IFN- $\gamma$  e a redução da capacidade microbicida de macrófagos (Burns *et al.*, 2006; Hajishengallis *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). Assim camundongos deficiente para TLR2 ou CR3 apresentam uma capacidade maior de eliminar a bactéria, e são mais resistentes a perda óssea (Hajishengallis, Wang, Liang *et al.*, 2008). Da mesma forma o estímulo induzido pela fimbria bacteriana, é capaz de promover a dimerização de TLR2 com o receptor de quimiocina CXCR4. Essa dimerização induz a inibição da síntese de NO e TNF- $\alpha$ , reduzindo também a ação microbicida de macrófagos .

Infelizmente, ainda não sabemos se as condições de infecção utilizadas neste trabalho resultam no estabelecimento de uma infecção persistente, condição *sine qua non* para o estudo da participação de IFN- $\gamma$ , IL-17 e TLR2 no modelo de periodontite crônica. Versões modificadas de nosso modelo irão ajudar a esclarecer o impacto da ativação do eixo TLR2/B<sub>2</sub>R na imunopatogênese da doença periodontal.

Em sumário, nosso trabalho revela que o LPS e a gingipaína de *P. gingivalis*, respectivamente, agindo como ligante de TLR2 e como protease liberadora de cinina, ativam o eixo inato TLR2/B<sub>2</sub>R, amplificando a inflamação ao mesmo tempo em que geram sinais de

perigo endógeno (cininas), que por sua vez guiam o desenvolvimento de células T efetoras específicas contra o antígeno fimbria (Figura 14).



**Figura 14:** A ativação do eixo TLR2/ $B_2R$  nos tecidos extravasculares de mucosa é responsável pela montagem da resposta T fimbria-específica Th1/Th17. Do lado esquerdo da figura *P. gingivalis* W83 (injetada intrabucalmente) estimula TLR2 em células residentes do sistema imune inato, ainda não caracterizadas (ex. células epiteliais da gengiva, macrófagos e mastócitos). Este reconhecimento se traduz pela secreção de quimiocinas/citocinas que rapidamente amplificam a inflamação por ativar neutrófilos e o endotélio. O extravasamento de plasma promove acúmulo de proteínas plasmáticas, incluindo cininogênio (centro da figura). A cisteína protease gingipaína libera proteoliticamente, do cininogênio, o peptídeo vasoativo bradicinina. A ligação desta a seu receptor  $B_2R$  no endotélio promove a amplificação do extravasamento de plasma e conseqüentemente acúmulo de bradicinina. Baseado em análises imunológicas do papel das cininas liberadas pelo *T. cruzi* (Monteiro, Schmitz et al., 2006; Scharfstein, 2007; Scharfstein, Monteiro et al., 2008), nós hipotetizamos que células dendríticas imaturas (mieloides) presentes na mucosa inflamada são ativadas via cinina/ $B_2R$ . Após migrarem para os linfonodos submandibulares drenantes, essas células dendríticas ativam células T virgens estimulando sua diferenciação em células produtoras de IFN- $\gamma$  (BALB/c e C57BL6) e IL-17 (BALB/c).

## Referências

Abu-Amer, Y., Ross, F. P., Edwards, J. e Teitelbaum, S. L. Lipopolysaccharide-stimulated osteoclastogenesis is mediated by tumor necrosis factor via its P55 receptor. J. Clin. Invest., n.6, p.1557-1565. 1997.

Aida, Y., Kusumoto, K., Nakatomi, K., Takada, H., Pabst, M. J. e Maeda, K. An analogue of lipid A and LPS from *Rhodobacter sphaeroides* inhibits neutrophil responses to LPS by blocking receptor recognition of LPS and by depleting LPS-binding protein in plasma. J Leukoc Biol, n.6, p.675-682. 1995.

Akuthota, P., Wang, H. B., Spencer, L. A. e Weller, P. F. Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell. Clin Exp Allergy, n.8, p.1254-1263. 2008.

Aliberti, J., Viola, J. P. B., Vieira-De-Abreu, A., Bozza, P. T., Sher, A. e Scharfstein, J. Cutting Edge: Bradykinin Induces IL-12 Production by Dendritic Cells: A Danger Signal That Drives Th1 Polarization. J Immunol, n.11, p.5349-5353. 2003.

Amano, A. Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. J Periodontol, n.1, p.90-96. 2003.

Amano, A., Nakagawa, I., Kataoka, K., Morisaki, I. e Hamada, S. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with *fimA* genotypes in periodontitis patients. J Clin Microbiol, n.5, p.1426-1430. 1999.

Amano, A., Nakamura, T., Kimura, S., Morisaki, I., Nakagawa, I., Kawabata, S. e Hamada, S. Molecular interactions of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae with host proteins: kinetic analyses based on surface plasmon resonance. Infect Immun, n.5, p.2399-2405. 1999.

Anusaksathien, O., Singh, G., Matthews, N. e Dolby, A. E. Autoimmunity to collagen in adult periodontal disease: immunoglobulin classes in sera and tissue. J Periodontal Res, n.1, p.55-61. 1992.

Asai, Y., Ohshima, Y., Gen, K. e Ogawa, T. Bacterial Fimbriae and Their Peptides Activate Human Gingival Epithelial Cells through Toll-Like Receptor 2. Infect Immun, n.12, p.7387-7395. 2001.

Aslam, R., Speck, E. R., Kim, M., Crow, A. R., Bang, K. W., Nestel, F. P., Ni, H., Lazarus, A. H., Freedman, J. e Semple, J. W. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor- $\alpha$  production in vivo. Blood, n.2, p.637-641. 2006.

Baker, P. J., Dixon, M., Evans, R. T., Dufour, L., Johnson, E. e Roopenian, D. C. CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. Infect Immun, n.6, p.2804-2809. 1999.

Barbasz, A., Guevara-Lora, I., Rapala-Kozik, M. e Kozik, A. Kininogen binding to the surfaces of macrophages. Int Immunopharmacol, n.2, p.211-216. 2008.

Ben Nasr, A., Herwald, H., Sjöbring, U., Renné, T., Müller-Esterl, W. e Björck, L. Absorption of kininogen from human plasma by *Streptococcus pyogenes* is followed by the release of bradykinin. Biochem J, n.326, p.657-660. 1997.

Bendelac, A., Rivera, M. N., Park, S. H. e Roark, J. H. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. Annu Rev Immunol, p.535-562. 1997.

Berglundh, T. e Donati, M. Aspects of adaptive host response in periodontitis. J Clin Periodontol, p.87-107. 2005.

Bertram, C. M., Misso, N. L., Fogel-Petrovic, M., Figueroa, C. D., Foster, P. S., Thompson, P. J. e Bhoola, K. D. Expression of kinin receptors on eosinophils: comparison of asthmatic patients and healthy subjects. J Leukoc Biol, n.3, p.544-552. 2009.

Bhoola, K. D., Figueroa, C. D. e Worthy, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. Pharmacol Rev, n.1, p.1-80. 1992.

Brigl, M. e Brenner, M. B. CD1: antigen presentation and T cell function. Annu Rev Immunol, p.817-890. 2004.

Brigl, M., Bry, L., Kent, S. C., Gumperz, J. E. e Brenner, M. B. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. Nat Immunol, n.12, p.1230-1237. 2003.

Burns, E., Bachrach, G., Shapira, L. e Nussbaum, G. Cutting Edge: TLR2 Is Required for the Innate Response to *Porphyromonas gingivalis*: Activation Leads to Bacterial Persistence and TLR2 Deficiency Attenuates Induced Alveolar Bone Resorption. J Immunol, n.12, p.8296-8300. 2006.

Cardoso, C. R., Garlet, G. P., Crippa, G. E., Rosa, A. L., Junior, W. M., Rossi, M. A. e Silva, J. S. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. Oral Microbiol Immunol, n.1, p.1-6. 2009.

Carlos, D., Frantz, F. G., Souza-Junior, D. A., Jamur, M. C., Oliver, C., Ramos, S. G., Quesniaux, V. F., Ryffel, B., Silva, C. L., Bozza, M. T. e Faccioli, L. H. TLR2-dependent mast cell activation contributes to the control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Microbes Infect, n.8, p. 770-778. 2009.

Chen, Z., Potempa, J., Polanowski, A., Wikstrom, M. e Travis, J. Purification and characterization of a 50-kDa cysteine proteinase (gingipain) from *Porphyromonas gingivalis*. J Biol Chem, n.26, p.18896-18901. 1992.

Chiang, C. Y., Kyritsis, G., Graves, D. T. e Amar, S. Interleukin-1 and tumor necrosis factor activities partially account for calvarial bone resorption induced by local injection of lipopolysaccharide. Infect Immun, n.8, p.4231-4236. 1999.

Chiba, A., Dascher, C. C., Besra, G. S. e Brenner, M. B. Rapid NKT cell responses are self-terminating during the course of microbial infection. J Immunol, n.4, p.2292-2302. 2008.

- Cognasse, F., Hamzeh, H., Chavarin, P., Acquart, S., Genin, C. e Garraud, O. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. Immunol Cell Biol, n.2, p.196-198. 2005.
- Colombo, A. V., Silva, C. M., Haffajee, A. e Colombo, A. P. V. Identification of oral bacteria associated with crevicular epithelial cells from chronic periodontitis lesions. J Med Microbiol, n.5, p.609-615. 2006.
- Couture, R., Harrisson, M., Vianna, R. M. e Cloutier, F. Kinin receptors in pain and inflammation. Eur J Pharmacol, n.1-3, p.161-176. 2001.
- Cutler, C. W. e Jotwani, R. Dendritic Cells at the Oral Mucosal Interface. J of Dental Research, n.8, p.678-689. 2006.
- Cutler, C. W. e Teng, Y. T. Oral mucosal dendritic cells and periodontitis: many sides of the same coin with new twists. Periodontol 2000, p.35-50. 2007.
- Darveau, R. P., Pham, T.-T. T., Lemley, K., Reife, R. A., Bainbridge, B. W., Coats, S. R., Howald, W. N., Way, S. S. e Hajjar, A. M. Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide Contains Multiple Lipid A Species That Functionally Interact with Both Toll-Like Receptors 2 and 4. Infect Immun, n.9, p.5041-5051. 2004.
- Davey, M., Liu, X., Ukai, T., Jain, V., Gudino, C., Gibson, F. C., Golenbock, D., Visintin, A. e Genco, C. A. Bacterial Fimbriae Stimulate Proinflammatory Activation in the Endothelium through Distinct TLRs. J Immunol, n.4, p.2187-2195. 2008.
- Deshpande, R. G., Khan, M. B. e Genco, C. A. Invasion of aortic and heart endothelial cells by Porphyromonas gingivalis. Infect Immun, n.11, p.5337-5343. 1998.
- Dixon, D. R., Bainbridge, B. W. e Darveau, R. P. Modulation of the innate immune response within the periodontium. Periodontol 2000, n.1, p.53-74. 2004.
- Eley, B. M. e Cox, S. W. Correlation between gingivain/gingipain and bacterial dipeptidyl peptidase activity in gingival crevicular fluid and periodontal attachment loss in chronic periodontitis patients. A 2-year longitudinal study. J Periodontol, n.7, p.703-716. 1996.
- Faure, E., Equils, O., Sieling, P. A., Thomas, L., Zhang, F. X., Kirschning, C. J., Polentarutti, N., Muzio, M. e Arditi, M. Bacterial Lipopolysaccharide Activates NF-kappa B through Toll-like Receptor 4 (TLR-4) in Cultured Human Dermal Endothelial Cells. DIFFERENTIAL EXPRESSION OF TLR-4 AND TLR-2 IN ENDOTHELIAL CELLS. J. Biol. Chem., n.15, p.11058-11063. 2000.
- Frick, I. M., Akesson, P., Herwald, H., Mörgelin, M., Malmsten, M., Nägler, D. K. e Björck, L. The contact system--a novel branch of innate immunity generating antibacterial peptides. EMBO J, n.23, p.5569-5578. 2006.
- Gaffen, S. L. Biology of recently discovered cytokines: interleukin-17--a unique inflammatory cytokine with roles in bone biology and arthritis. Arthritis Res Ther, n.6, p.240-247. 2004.

- Gao, Y., Grassi, F., Ryan, M. R., Terauchi, M., Page, K., Yang, X., Weitzmann, M. N. e Pacifici, R. IFN-gamma stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. J Clin Invest, n.1, p.122-132. 2007.
- Gibson, F. C., Iii, Hong, C., Chou, H.-H., Yumoto, H., Chen, J., Lien, E., Wong, J. e Attardo Genco, C. Innate Immune Recognition of Invasive Bacteria Accelerates Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. Circulation, n.22, p.2801-2806. 2004.
- Gilbert, L., He, X., Farmer, P., Boden, S., Kozlowski, M., Rubin, J. e Nanes, M. S. Inhibition of Osteoblast Differentiation by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . 141: 3956-3964 p. 2000.
- Govze, Y. e Herzberg, M. C. Serum and gingival crevicular fluid anti-desmosomal antibodies in periodontitis. J Periodontol, n.7, p.603-608. 1993.
- Graves, D. T., Naguib, G., Lu, H., Desta, T. e Amar, S. Porphyromonas gingivalis fimbriae are pro-inflammatory but do not play a prominent role in the innate immune response to P. gingivalis. J. Endot. Res., n.11, p.13-18. 2005.
- Greengard, J. S. e Griffin, J. H. Receptors for high molecular weight kininogen on stimulated washed human platelets. Biochemistry, n.26, p.6863-6869. 1984.
- Gustafson, E. J., Schmaier, A. H., Wachtfogel, Y. T., Kaufman, N., Kucich, U. e Colman, R. W. Human neutrophils contain and bind high molecular weight kininogen. J Clin Invest, n.1, p.28-35. 1989.
- Gustafson, E. J., Schutsky, D., Knight, L. C. e Schmaier, A. H. High molecular weight kininogen binds to unstimulated platelets. J Clin Invest, n.1, p.310-318. 1986.
- Haffajee, A. D. e Socransky, S. S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000, p.78-111. 1994.
- Hajishengallis, G., Ratti, P. e Harokopakis, E. Peptide mapping of bacterial fimbrial epitopes interacting with pattern recognition receptors. J Biol Chem, n.47, p.38902-38913. 2005.
- Hajishengallis, G., Shakhathreh, M. A., Wang, M. e Liang, S. Complement receptor 3 blockade promotes IL-12-Mediated Clearance of Porphyromonas gingivalis and Negates Its Virulence In Vivo. J Immunol, n.4, p.2359-2367. 2007.
- Hajishengallis, G., Tapping, R. I., Harokopakis, E., Nishiyama, S., Ratti, P., Schifferle, R. E., Lyle, E. A., Triantafilou, M., Triantafilou, K. e Yoshimura, F. Differential interactions of fimbriae and lipopolysaccharide from Porphyromonas gingivalis with the Toll-like receptor 2-centred pattern recognition apparatus. Cell Microbiol, n.10, p.1557-1570. 2006.
- Hajishengallis, G., Wang, M., Bagby, G. J. e Nelson, S. Importance of TLR2 in early innate immune response to acute pulmonary infection with Porphyromonas gingivalis in mice. J Immunol, n.6, p.4141-4149. 2008.

- Hajishengallis, G., Wang, M., Liang, S., Triantafilou, M. e Triantafilou, K. Pathogen induction of CXCR4/TLR2 cross-talk impairs host defense function. Proc Natl Acad Sci U S A, n.36, p.13532-13537. 2008.
- Hamada, N., Sojar, H. T., Cho, M. I. e Genco, R. J. Isolation and characterization of a minor fimbria from *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun, n.11, p.4788-4794. 1996.
- Han, X., Kawai, T., Eastcott, J. W. e Taubman, M. A. Bacterial-responsive B lymphocytes induce periodontal bone resorption. J Immunol, n.1, p.625-631. 2006.
- Henderson, L. M., Figueroa, C. D., Muller-Esterl, W. e Bhoola, K. D. Assembly of contact-phase factors on the surface of the human neutrophil membrane. Blood, n.2, p.474-482. 1994.
- Holt, S. C. e Bramanti, T. E. Factors in Virulence Expression and Their Role in Periodontal Disease Pathogenesis. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, n.2, p.177-281. 1991.
- Horne, W. C., Neff, L., Chatterjee, D., Lomri, A., Levy, J. B. e Baron, R. Osteoclasts express high levels of pp60c-src in association with intracellular membranes. J Cell Biol, n.4, p.1003-1013. 1992.
- Horton, J. E., Raisz, L. G., Simmons, H. A., Oppenheim, J. J. e Mergenhagen, S. E. Bone resorbing activity in supernatant fluid from cultured human peripheral blood leukocytes. Science, n.51, p.793-795. 1972.
- Hosoi, K., Matsuura, S., Tsumura, K., Wei, W., Parvin, M. N., Tada, J., Akamatsu, T., Kanamori, N. e Suzuki, K. Expression of kininogens in the connective tissue-type mast cells of the rat. Immunology, n.4, p.531-540. 2000.
- Hu, S.-W., Huang, C. H., Huang, H. C., Lai, Y. Y. e Lin, Y. Y. Transvascular dissemination of *Porphyromonas gingivalis* from a sequestered site is dependent upon activation of the kallikrein/kinin pathway. J of Periodontal Research, n.3, p.200-207. 2006.
- Imamura, T. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. J Periodontol, n.1, p.111-118. 2003.
- Imamura, T., Potempa, J., Pike, R. N. e Travis, J. Dependence of vascular permeability enhancement on cysteine proteinases in vesicles of *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun, n.5, p.1999-2003. 1995.
- Imamura T, P. R., Potempa J, Travis J Pathogenesis of periodontitis: a major arginine-specific cysteine proteinase from *Porphyromonas gingivalis* induces vascular permeability enhancement through activation of the kallikrein/kinin pathway. . J. Clin. Invest., p.361-367. 1994.
- Jotwani, R. e Cutler, C. W. Fimbriated *Porphyromonas gingivalis* Is More Efficient than Fimbria-Deficient *P. gingivalis* in Entering Human Dendritic Cells In Vitro and Induces an Inflammatory Th1 Effector Response. Infect Immun, n.3, p.1725-1732. 2004.

Kadowaki, T., Nakayama, K., Okamoto, K., Abe, N., Baba, A., Shi, Y., Ratnayake, D. B. e Yamamoto, K. Porphyromonas gingivalis proteinases as virulence determinants in progression of periodontal diseases. J Biochem, n.2, p.153-159. 2000.

Kesavalu, L., Chandrasekar, B. e Ebersole, J. L. In vivo induction of proinflammatory cytokines in mouse tissue by Porphyromonas gingivalis and Actinobacillus actinomycetemcomitans. Oral Microbiol Immunol, n.3, p.177-180. 2002.

Kong, Y.-Y., Feige, U., Sarosi, I., Bolon, B., Tafuri, A., Morony, S., Capparelli, C., Li, J., Elliott, R., McCabe, S., Wong, T., Campagnuolo, G., Moran, E., Bogoch, E. R., Van, G., Nguyen, L. T., Ohashi, P. S., Lacey, D. L., Fish, E., Boyle, W. J. e Penninger, J. M. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. Nature, n.6759, p.304-309. 1999.

Kong, Y.-Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H.-L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-Dos-Santos, A. J., Van, G., Itie, A., Khoo, W., Wakeham, A., Dunstan, C. R., Lacey, D. L., Mak, T. W., Boyle, W. J. e Penninger, J. M. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. Nature, n.6717, p.315-323. 1999.

Kozarov, E. V., Dorn, B. R., Shelburne, C. E., Dunn, W. A., Jr. e Progulsk-Fox, A. Human Atherosclerotic Plaque Contains Viable Invasive Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis. Arterioscler Thromb Vasc Biol, n.3, p.e17-18. 2005.

Lamont, R. J., Chan, A., Belton, C. M., Izutsu, K. T., Vasel, D. e Weinberg, A. Porphyromonas gingivalis invasion of gingival epithelial cells. Infect Immun, n.10, p.3878-3885. 1995.

Lamont, R. J. e Jenkinson, H. F. Life Below the Gum Line: Pathogenic Mechanisms of Porphyromonas gingivalis. Microbiol. Mol. Biol. Rev., n.4, p.1244-1263. 1998.

Lamont, R. J. e Yilmaz, O. In or out: the invasiveness of oral bacteria. Periodontol 2000, p.61-69. 2002.

Le Borgne, M., Etchart, N., Goubier, A., Lira, S. A., Sirard, J. C., Van Rooijen, N., Caux, C., Ait-Yahia, S., Vicari, A., Kaiserlian, D. e Dubois, B. Dendritic Cells Rapidly Recruited into Epithelial Tissues via CCR6/CCL20 Are Responsible for CD8+ T Cell Crosspriming In Vivo. Immunity, n.2, p.191-201. 2006.

Leeb-Lundberg, L. M. F., Marceau, F., Muller-Esterl, W., Pettibone, D. J. e Zuraw, B. L. International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the Kinin Receptor Family: from Molecular Mechanisms to Pathophysiological Consequences. Pharmacol Rev, n.1, p.27-77. 2005.

Liao, F., Li, Z., Wang, Y., Shi, B., Gong, Z. e Cheng, X. Porphyromonasgingivalis may play an important role in the pathogenesis of periodontitis-associated rheumatoid arthritis. Medical Hypotheses [Epub ahead of print]. 2009.

- Mangan, P. R., Harrington, L. E., O'quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., Hatton, R. D., Wahl, S. M., Schoeb, T. R. e Weaver, C. T. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. Nature, n.7090, p.231-234. 2006.
- Mansheim, B. J., Onderdonk, A. B. e Kasper, D. L. Immunochemical and Biologic Studies of the Lipopolysaccharide of *Bacteroides Melaninogenicus* Subspecies *Asaccharolyticus*. 120: 72-78 p. 1978.
- Marceau, F. e Bachvarov, D. R. Kinin receptors. Clin Rev Allergy Immunol, n.4, p.385-401. 1998.
- Mawhorter, S. D., Kazura, J. W. e Boom, W. H. Human eosinophils as antigen-presenting cells: relative efficiency for superantigen- and antigen-induced CD4+ T-cell proliferation. Immunology, n.4, p.584-591. 1994.
- Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol, n.2, p.135-145. 2001.
- Mezyk-Kopec, R., Bzowska, M., Potempa, J., Bzowska, M., Jura, N., Sroka, A., Black, R. A. e Bereta, J. Inactivation of membrane tumor necrosis factor alpha by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun, n.3, p.1506-1514. 2005.
- Monteiro, A. C., Schmitz, V., Morrot, A., Arruda, L. B., Nagajyothi, F., Granato, A., Pesquero, J. B., Müller-Esterl, W., Tanowitz, H. B. e Scharfstein, J. Bradykinin B2 Receptors of dendritic cells, acting as sensors of kinins proteolytically released by *Trypanosoma cruzi*, are critical for the development of protective type-1 responses. PLoS Pathog p.185e. 2007.
- Monteiro, A. C., Schmitz, V., Svensjo, E., Gazzinelli, R., Almeida, I. C., Todorov, A., Arruda, L. B., Torrecilhas, A. C. T., Pesquero, J. B., Morrot, A., Bouskela, E., Bonomo, A., Lima, A. P. C. A., Muller-Esterl, W. e Scharfstein, J. Cooperative Activation of TLR2 and Bradykinin B2 Receptor Is Required for Induction of Type 1 Immunity in a Mouse Model of Subcutaneous Infection by *Trypanosoma cruzi*. J Immunol, n.9, p.6325-6335. 2006.
- Monteiro, A. C., Scovino, A., Raposo, S., Gaze, V. M., Cruz, C., Svensjo, E., Narciso, M. S., Colombo, A. P., Pesquero, J. B., Feres-Filho, E., Nguyen, K. A., Sroka, A., Potempa, J. e Scharfstein, J. Kinin danger signals proteolytically released by gingipain induce Fimbriae-specific IFN-gamma- and IL-17-producing T cells in mice infected intramucosally with *Porphyromonas gingivalis*. J Immunol, n.6, p.3700-3711. 2009.
- Mooney, J. e Kinane, D. F. Humoral immune responses to *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adult periodontitis and rapidly progressive periodontitis. Oral Microbiol Immunol, n.6, p.321-326. 1994.
- Moreau, M. E., Garbacki, N., Molinaro, G., Brown, N. J., Marceau, F. e Adam, A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. J Pharmacol Sci, n.1, p.6-38. 2005.
- Mrabet-Dahbi, S., Metz, M., Dudeck, A., Zuberbier, T. e Maurer, M. Murine mast cells secrete a unique profile of cytokines and prostaglandins in response to distinct TLR2 ligands. Exp Dermatol, n.5, p.437-444. 2009.

Muller, F. e Renne, T. Novel roles for factor XII-driven plasma contact activation system. Curr Opin Hematol, n.5, p.516-521. 2008.

Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., Van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L. P., Allavena, P. e Mantovani, A. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. J Immunol, n.11, p.5998-6004. 2000.

Naito, M., Hirakawa, H., Yamashita, A., Ohara, N., Shoji, M., Yukitake, H., Nakayama, K., Toh, H., Yoshimura, F., Kuhara, S., Hattori, M., Hayashi, T. e Nakayama, K. Determination of the genome sequence of Porphyromonas gingivalis strain ATCC 33277 and genomic comparison with strain W83 revealed extensive genome rearrangements in P. gingivalis. DNA Res, n.4, p.215-225. 2008.

Nakajima, T., Amanuma, R., Ueki-Maruyama, K., Oda, T., Honda, T., Ito, H. e Yamazaki, K. CXCL13 expression and follicular dendritic cells in relation to B-cell infiltration in periodontal disease tissues. J Periodontal Res, n.6, p.635-641. 2008.

Nakamura, N., Yoshida, M., Umeda, M., Huang, Y., Kitajima, S., Inoue, Y., Ishikawa, I. e Iwai, T. Extended exposure of lipopolysaccharide fraction from Porphyromonas gingivalis facilitates mononuclear cell adhesion to vascular endothelium via Toll-like receptor-2 dependent mechanism. Atherosclerosis, n.1, p.59-67. 2008.

Nakashima, T., Kobayashi, Y., Yamasaki, S., Kawakami, A., Eguchi, K., Sasaki, H. e Sakai, H. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. Biochem Biophys Res Commun, n.3, p.768-775. 2000.

Nakayama, K., Yoshimura, F., Kadowaki, T. e Yamamoto, K. Involvement of arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain) in fimbriation of Porphyromonas gingivalis. J Bacteriol, n.10, p.2818-2824. 1996.

Nguyen, K.-A., Travis, J. e Potempa, J. Does the Importance of the C-Terminal Residues in the Maturation of RgpB from Porphyromonas gingivalis Reveal a Novel Mechanism for Protein Export in a Subgroup of Gram-Negative Bacteria? J. Bacteriol., n.3, p.833-843. 2007.

Noiri, Y., Li, L., Yoshimura, F. e Ebisu, S. Localization of Porphyromonas gingivalis-carrying fimbriae in situ in human periodontal pockets. J Dent Res, n.12, p.941-945. 2004.

Okahashi, N., Inaba, H., Nakagawa, I., Yamamura, T., Kuboniwa, M., Nakayama, K., Hamada, S. e Amano, A. Porphyromonas gingivalis induces receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblasts through the activator protein 1 pathway. Infect Immun, n.3, p.1706-1714. 2004.

Onoe, T., Hoover, C. I., Nakayama, K., Ideka, T., Nakamura, H. e Yoshimura, F. Identification of Porphyromonas gingivalis pefimbrilin possessing a long leader peptide: possible involvement of trypsin-like protease in fimbriation maturation. Microb Pathog, n.5, p.351-364. 1995.

Opal, S. M. The host response to endotoxin, antilipoplysaccharide strategies, and the management of severe sepsis. Int J Med Microbiol, n.5, p.365-377. 2007.

Padigel, U. M., Lee, J. J., Nolan, T. J., Schad, G. A. e Abraham, D. Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to *Strongyloides stercoralis*. Infect Immun, n.6, p.3232-3238. 2006.

Potempa, J., Mikolajczyk-Pawlinska, J., Brassell, D., Nelson, D., Thogersen, I. B., Enghild, J. J. e Travis, J. Comparative properties of two cysteine proteinases (gingipains R), the products of two related but individual genes of *Porphyromonas gingivalis*. J Biol Chem, n.34, p.21648-21657. 1998.

Quinn, J. M., Horwood, N. J., Elliott, J., Gillespie, M. T. e Martin, T. J. Fibroblastic stromal cells express receptor activator of NF-kappa B ligand and support osteoclast differentiation. J Bone Miner Res, n.8, p.1459-1466. 2000.

Rajapakse, P. S. e Dolby, A. E. Evidence for local production of antibodies to auto and non-self antigens in periodontal disease. Oral Dis, n.2, p.99-105. 2004.

Riedemann, N. C., Guo, R. F., Hollmann, T. J., Gao, H., Neff, T. A., Reuben, J. S., Speyer, C. L., Sarma, J. V., Wetsel, R. A., Zetoune, F. S. e Ward, P. A. Regulatory role of C5a in LPS-induced IL-6 production by neutrophils during sepsis. Faseb J, n.2, p.370-372. 2004.

Roberts, F. A., Richardson, G. J. e Michalek, S. M. Effects of *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* lipopolysaccharides on mononuclear phagocytes. Infect Immun, n.8, p.3248-3254. 1997.

Ropert, C. e Gazzinelli, R. T. Regulatory role of Toll-like receptor 2 during infection with *Trypanosoma cruzi*. J Endotoxin Res, n.6, p.425-430. 2004.

Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., Cua, D. J. e Takayanagi, H. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. J Exp Med, n.12, p.2673-2682. 2006.

Scharfstein, J., Monteiro, A. C., Schmitz, V. e Svensjo, E. Angiotensin-converting enzyme limits inflammation elicited by *Trypanosoma cruzi* cysteine proteases: a peripheral mechanism regulating adaptive immunity via the innate kinin pathway. Biol Chem. 2008.

Scharfstein, J., Schmitz, V., Svensjö, E., Granato, A. e Monteiro, A. C. Kininogens Coordinate Adaptive Immunity through the Proteolytic Release of Bradykinin, an Endogenous Danger Signal Driving Dendritic Cell Maturation. Scandinavian Journal of Immunology, n.2-3, p.128-136. 2007.

Schmitz, V., Svensjo, E., Serra, R. R., Teixeira, M. M. e Scharfstein, J. Proteolytic generation of kinins in tissues infected by *Trypanosoma cruzi* depends on CXC chemokine secretion by macrophages activated via Toll-like 2 receptors. J Leukoc Biol, p.1108693. 2009.

Shi, H. Z., Humbles, A., Gerard, C., Jin, Z. e Weller, P. F. Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. J Clin Invest, n.7, p.945-953. 2000.

- Shiotani, A., Shibasaki, Y. e Sasaki, T. Localization of receptor activator of NFkappaB ligand, RANKL, in periodontal tissues during experimental movement of rat molars. J Electron Microsc (Tokyo), n.4, p.365-369. 2001.
- Skidgel, R. A. e Erdos, E. G. Angiotensin converting enzyme (ACE) and neprilysin hydrolyze neuropeptides: a brief history, the beginning and follow-ups to early studies. Peptides, n.3, p.521-525. 2004.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. e Kent, R. L., Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol, n.2, p.134-144. 1998.
- Stark, M. A., Huo, Y., Burcin, T. L., Morris, M. A., Olson, T. S. e Ley, K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. Immunity, n.3, p.285-294. 2005.
- Stashenko, P., Dewhirst, F. E., Rooney, M. L., Desjardins, L. A. e Heeley, J. D. Interleukin-1 $\beta$  is a potent inhibitor of bone formation in vitro. J. Bone Miner. Res., p.559-565. 1987.
- Stashenko, P., Goncalves, R. B., Lipkin, B., Ficarella, A., Sasaki, H. e Campos-Neto, A. Th1 immune response promotes severe bone resorption caused by Porphyromonas gingivalis. Am J Pathol, n.1, p.203-213. 2007.
- Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M. T. e Martin, T. J. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. Endocr Rev, n.3, p.345-357. 1999.
- Sugawara, S., Nemoto, E., Tada, H., Miyake, K., Imamura, T. e Takada, H. Proteolysis of human monocyte CD14 by cysteine proteinases (gingipains) from Porphyromonas gingivalis leading to lipopolysaccharide hyporesponsiveness. J Immunol, n.1, p.411-418. 2000.
- Svensjö, E., Batista, P. R., Brodskyn, C. I., Silva, R., Lima, A. P., Schmitz, V., Saraiva, E., Pesquero, J. B., Mori, M. A., Müller-Esterl, W. e Scharfstein, J. Interplay between parasite cysteine proteases and the host kinin system modulates microvascular leakage and macrophage infection by promastigotes of the Leishmania donovani complex Microbes Infect., n.1, p.206-220. 2006.
- Svensjö E, B. P., Brodskyn Ci, Silva R, Lima Ap, Schmitz V, Saraiva E, Pesquero Jb, Mori Ma, Müller-Esterl W, Scharfstein J. Interplay between parasite cysteine proteases and the host kinin system modulates microvascular leakage and macrophage infection by promastigotes of the Leishmania donovani complex Microbes Infect., n.1, p.206-220. 2006.
- Svensjö, E., Saraiva, E. M., Bozza, M. T., Oliveira, S. M. P., Lerner, E. A. e Scharfstein, J. Salivary Gland Homogenates of Lutzomyia longipalpis and Its Vasodilatory Peptide Maxadilan Cause Plasma Leakage via PAC1 Receptor Activation. Journal of Vascular Research, n.5, p.435-446. 2009.

Tabeta, K., Yamazaki, K., Akashi, S., Miyake, K., Kumada, H., Umemoto, T. e Yoshie, H. Toll-like receptors confer responsiveness to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts. Infect Immun, n.6, p.3731-3735. 2000.

Takahashi, Y., Davey, M., Yumoto, H., Gibson, F. C., 3rd e Genco, C. A. Fimbria-dependent activation of pro-inflammatory molecules in *Porphyromonas gingivalis* infected human aortic endothelial cells. Cell Microbiol, n.5, p.738-757. 2006.

Takayanagi, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. J Periodontol Res, n.4, p.287-293. 2005.

Takayanagi, H., Ogasawara, K., Hida, S., Chiba, T., Murata, S., Sato, K., Takaoka, A., Yokochi, T., Oda, H., Tanaka, K., Nakamura, K. e Taniguchi, T. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. Nature, n.6812, p.600-605. 2000.

Teitelbaum, S. L. Bone resorption by osteoclasts. Science, n.5484, p.1504-1508. 2000.

Travis, J., Pike, R., Imamura, T. e Potempa, J. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. J Periodontol Res, p.120-125. 1997.

Uehara, A., Imamura, T., Potempa, J., Travis, J. e Takada, H. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* synergistically induce the production of proinflammatory cytokines through protease-activated receptors with Toll-like receptor and NOD1/2 ligands in human monocytic cells. Cell Microbiol, n.5, p.1181-1189. 2008.

Van Bezooijen, R. L., Farih-Sips, H. C., Papapoulos, S. E. e Lowik, C. W. Interleukin-17: A new bone acting cytokine in vitro. J Bone Miner Res, n.9, p.1513-1521. 1999.

Walsh, M. C., Kim, N., Kadono, Y., Rho, J., Lee, S. Y., Lorenzo, J. e Choi, Y. OSTEOIMMUNOLOGY: Interplay Between the Immune System and Bone Metabolism. Annual Review, n.1, p.33-63. 2006.

Wang, M., Shakhathreh, M. A., James, D., Liang, S., Nishiyama, S., Yoshimura, F., Demuth, D. R. e Hajishengallis, G. Fimbrial proteins of *porphyromonas gingivalis* mediate in vivo virulence and exploit TLR2 and complement receptor 3 to persist in macrophages. J Immunol, n.4, p.2349-2358. 2007.

Wara-Aswapati, N., Surarit, R., Chayasodom, A., Boch, J. A. e Pitiphat, W. RANKL upregulation associated with periodontitis and *Porphyromonas gingivalis*. J Periodontol, n.6, p.1062-1069. 2007.

Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M. e Murphy, K. M. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. Immunity, n.6, p.677-688. 2006.

Wingrove, J. A., Discipio, R. G., Chen, Z., Potempa, J., Travis, J. e Hugli, T. E. Activation of complement components C3 and C5 by a cysteine proteinase (gingipain-1) from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. J Biol Chem, n.26, p.18902-18907. 1992.

- Ye, P., Rodriguez, F. H., Kanaly, S., Stocking, K. L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., Shellito, J. E., Bagby, G. J., Nelson, S., Charrier, K., Peschon, J. J. e Kolls, J. K. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. J Exp Med, n.4, p.519-527. 2001.
- Yoshimura, A., Kaneko, T., Kato, Y., Golenbock, D. T. e Hara, Y. Lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* are antagonists for human toll-like receptor 4. Infect Immun, n.1, p.218-225. 2002.
- Yu, J. J., Ruddy, M. J., Wong, G. C., Sfintescu, C., Baker, P. J., Smith, J. B., Evans, R. T. e Gaffen, S. L. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. Blood, n.9, p.3794-3802. 2007.
- Yun, L. W., Decarlo, A. A. e Hunter, N. Blockade of protease-activated receptors on T cells correlates with altered proteolysis of CD27 by gingipains of *Porphyromonas gingivalis*. Clin Exp Immunol, n.2, p.217-229. 2007.
- Yun, P. L., Decarlo, A. A. e Hunter, N. Modulation of major histocompatibility complex protein expression by human gamma interferon mediated by cysteine proteinase-adhesin polyproteins of *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun, n.6, p.2986-2995. 1999.
- Zhou, L., Ivanov, Ii, Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D. E., Leonard, W. J. e Littman, D. R. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. Nat Immunol, n.9, p.967-974. 2007.

# 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](#)