



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

GINGIPAÍNA E LIPOPOLISSACARÍDEO DE
Porphyromonas gingivalis **PROMOVEM O ELO ENTRE**
INFLAMAÇÃO E IMUNIDADE ADAPTATIVA VIA
RECEPTORES DE CININAS DO SUBTIPO B₂

Susane Barbosa Raposo, C.D.

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Odontologia (Periodontia).

Rio de Janeiro

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

GINGIPAÍNA E LIPOPOLISSACARÍDEO DE
Porphyromonas gingivalis PROMOVEM O ELO ENTRE
INFLAMAÇÃO E IMUNIDADE ADAPTATIVA VIA
RECEPTORES DE CININAS DO SUBTIPO B₂

Susane Barbosa Raposo, C.D.

Orientadores: Prof. Dr. Eduardo Jorge Feres Filho
Prof. Dr. Júlio Scharfstein

Dissertação apresentada a
Faculdade de Odontologia da
Universidade Federal do Rio de
Janeiro como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de Mestre
em Odontologia (Periodontia).

Rio de Janeiro

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Raposo, Susane Barbosa

Gingipaína e lipopolissacarídeo de *Porphyromonas gingivalis* promovem o elo entre inflamação e imunidade adaptativa via receptores de cininas do subtipo B₂. /Susane Barbosa Raposo. Rio de Janeiro, 2007.

xviii, 65 f; 8il.; 1,5cm

Dissertação (Mestrado em Periodontia) –
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Faculdade de Odontologia/Periodontia, 2007

Orientadores: Eduardo Jorge Feres Filho
Júlio Scharfstein

1. Periodontite crônica. 2. Gingipaína. 3. Patogênese.
4. *Porphyromonas gingivalis* – Teses.
I.Feres Filho, Eduardo Jorge (orient);
Scharfstein, Júlio (orient). II. Universidade
Federal do Rio de Janeiro. Faculdade de
Odontologia. Instituto de Pós-Graduação
em Periodontia. III. Título

RAPOSO, Susane Barbosa. Gingipaina e lipopolissacarídeo de *Porphyromonas gingivalis* promovem o elo entre inflamação e imunidade adaptativa via receptores de cininas do subtipo B₂. Orientadores: Eduardo Jorge Feres Filho e Júlio Scharfstein. Rio de Janeiro: FO/UFRJ, 2007. Dissertação (Mestrado em Odontologia- Periodontia).

PROFESSORES ORIENTADORES

Eduardo Jorge Feres Filho, D. Sc.

Professor Titular do Departamento de Clínica Odontológica

Júlio Scharfstein, D. Sc.

Professor Titular do Departamento de Biofísica IBCCF

COORDENADOR DOS CURSOS PARA GRADUADOS

Lincoln Nojima, D.Sc.

SUSANE BARBOSA RAPOSO

GINGIPAÍNA E LIPOPOLISSACARÍDEO DE
Porphyromonas gingivalis PROMOVEM O ELO ENTRE
INFLAMAÇÃO E IMUNIDADE ADAPTATIVA VIA
RECEPTORES DE CININAS DO SUBTIPO B₂

Rio de Janeiro, 21 de junho de 2007.

Dr. Carlos Marcelo da Silva Figueredo, Doutor em Periodontia (Inst. Karolinska, Suécia) – Professor Adjunto de Periodontia – UERJ.

Dra. Heloísa Carla Dell Santo Gusman, Doutora em Biologia Oral (Boston University, EUA) – Professora Adjunta de Endodontia – UFRJ.

Dra. Luciana de Barros Arruda, Doutora em Microbiologia-Imunologia (UFRJ) - Professora Adjunta de Microbiologia/Virologia – UFRJ.

AGRADECIMENTOS

Cursar mestrado não foi fácil. Exigiu muita paciência e persistência não só minha, mas também das pessoas que conviveram comigo. Por isso, tenho muito a agradecer...

Primeiramente a Deus, por todas as oportunidades que Ele me ofereceu e continua oferecendo e pelas pessoas maravilhosas que tem colocado na minha vida. Agradeço também pela proteção dada por Ele nestas muitas passagens pela Linha Vermelha, conhecida pelos cariocas como Faixa de Gaza. Foi preciso muita fé Nele.

Aos meus pais Manoel e Dalva que sempre fizeram questão de nos mostrar que o investimento na educação é o maior bem que os pais devem deixar para os filhos. Estejam certos que a mensagem foi captada por nós quatro, com muito orgulho.

Aos meus irmãos Alberto, Sávio e Djane pelo apoio moral, profissional e fraternal. Todos os três sempre foram exemplos para a irmã caçula.

Ao meu namorado Luiz Fernando. Não deve ser nada fácil namorar uma mestranda, além de agüentar estresse, problemas e assuntos chatos, ainda entendeu minha ausência nestes 2 anos. Com certeza exigiu muita paciência. Só amando muito mesmo!

Aos meus colegas de mestrado Celso, Cristine, David, Diogo, Hilana, Lorena, Natascha, Nilo e Vinícius, e de doutorado Carina e Renata. Foi muito bom conviver com vocês todos. Espero que a recíproca seja verdadeira.

Aos amigos de Laboratório Alda, Alessandra, Daniela, Daniele, Débora, Gabriela, Ilka, Iracema, Juliana, Larissa, Leila, Natália e Verônica. Desculpe o trabalho que dei para todos. Obrigada por tudo, principalmente pela paciência em me ajudar. Todos sempre muito acessíveis e prestativos.

Aos meus amigos de faculdade, especialização, aos amigos de profissão e os de outras profissões que nunca me abandonaram nas horas em que eu mais precisei.

Aos professores Ana Paula Colombo, Ana Tereza, Carmelo, Cynésia, Érik, Hanna e Ricardo Lima. Tenham certeza que todos contribuíram muito para o meu crescimento. Minha eterna gratidão.

Aos meus grandes incentivadores a cursar o mestrado: Professor Ricardo Fischer, Professor Carlos Marcelo e Camila. Obrigada pelo auxílio.

Ao professor Júlio Scharfstein. Imagino o quanto deve ter sido difícil orientar uma dentista em um Laboratório de Biofísica/Imunologia. Mas o senhor foi muito paciente comigo e isto foi fundamental para minha formação. Nossa parceria foi obra do destino, tudo graças à gingipaína e sua amizade pelo Jan Potempa.

Ao professor e orientador Eduardo Feres. O que eu posso dizer de uma pessoa que faz um aluno de segundo ano de odontologia se apaixonar pela periodontia sem sequer ter dado uma só aula para a minha turma? Sempre me apoiou e incentivou. Considere-se responsável por todas as minhas conquistas na periodontia ontem, hoje e sempre. Sou sua fã.

Deixei por último o agradecimento à Ana Carolina. Tenho várias testemunhas que comprovam que não estou sendo exagerada em dizer que esta tese não existiria sem você. Você foi fundamental para cada palavra, cada parágrafo, cada página deste trabalho. Tenha certeza que nos momentos mais difíceis deste mestrado você foi tudo. Ganhei mais uma irmã, uma amiga para a vida inteira. Muito obrigada pela ajuda na tese, pelos conselhos pessoais e profissionais, pelas caronas, pelas longas conversas pelo telefone, pela paciência. Enfim, obrigada por você ter aparecido em meu caminho. Jamais conseguirei agradecer e compensar o que você fez por mim. Conte comigo sempre.

Agradeço, também, aos outros amigos que não mencionei, amo todos vocês.

RESUMO

RAPOSO, Susane Barbosa. **Gingipaína e lipopolissacarídeo de *Porphyromonas gingivalis* promovem o elo entre inflamação e imunidade adaptativa via receptores de cininas do subtipo B₂**. Rio de Janeiro, 2007. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, UFRJ, Rio de Janeiro, 2007. Orientadores: Eduardo Jorge Feres Filho e Júlio Scharfstein. Rio de Janeiro: FO/UFRJ, 2007. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Periodontia).

A infecção por *Porphyromonas gingivalis*, bactéria anaeróbica gram-negativa, tem sido associada com a patogênese da periodontite crônica. Estudos recentes caracterizam o LPS, lipopolissacarídeo presente na superfície bacteriana, e a cisteíno-protease gingipaína como potentes fatores de virulência deste patógeno. Recentemente, Aliberti e colaboradores demonstraram que estímulo com bradicinina (BK) é capaz de ativar células dendríticas (DCs) imaturas através de seu receptor constitutivo B₂R, levando à indução de respostas imunes adaptativas T_H1. Estudos posteriores, utilizando modelo experimental de infecção com *Trypanosoma. cruzi*, reportaram que a geração de BK ocorre a partir do extravasamento de plasma e entrada de cininogênio plasmático no sítio infeccioso, eventos dependentes da ativação dos receptores TLR2 e B₂R. Nesta dissertação, verificou-se que a resposta imune adaptativa induzida por *P. gingivalis* ou seus componentes é dependente da ativação de TLR2 e B₂R. Gingipaína (RgpB) e LPS (ligante de TLR2) foram inoculados, isoladamente ou em conjunto, em patas de camundongos da linhagem BALB/c. Após o período de 3 e 24 horas após a inoculação, a resposta edematogênica foi determinada pelo método volumétrico. Os resultados mostraram que injeções contendo somente LPS ou gingipaína não foram capazes de induzir resposta edematogênica significativa. Entretanto, a associação destas duas moléculas induziu respostas edematogênicas consistentes que, por sua vez, não ocorreram em camundongos TLR2^{-/-}, ou selvagens tratados previamente com HOE-140, antagonistas do receptor B₂R. Utilizando modelo de imunização com o antígeno ovalbumina (OVA) associado a LPS/gingipaína, observou-se que essas moléculas foram capazes de induzir respostas adaptativas T_H1 intensas. Essa resposta não foi observada em camundongos TLR2^{-/-} ou selvagens tratados previamente com HOE-140. Os camundongos BALB/c previamente tratados com HOE-140 ou inoculados com gingipaína tratada previamente com seu inibidor específico, apresentaram respostas adaptativas T_H2 intensas. Os dados do presente trabalho indicam que gingipaína e LPS de *P. gingivalis* agem sinergicamente na integração da inflamação com a resposta adaptativa T_H1 através da ativação dos receptores TLR2/B₂R.

ABSTRACT

RAPOSO, Susane Barbosa. **Gingipaína e lipopolissacarídeo de *Porphyromonas gingivalis* promovem o elo entre inflamação e imunidade adaptativa via receptores de cininas do subtipo B₂.** Rio de Janeiro, 2007. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, UFRJ, Rio de Janeiro, 2007. Orientadores: Eduardo Jorge Feres Filho e Júlio Scharfstein. Rio de Janeiro: FO/UFRJ, 2007. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Periodontia).

Porphyromonas gingivalis, a gram-negative anaerobic bacterium, is involved in the pathogenesis of chronic periodontitis. Recent studies have highlighted the importance of LPS and cysteine protease gingipain from *P. gingivalis* as important virulence factors. We have previously reported that exogenous bradykinin activates immature DC via B₂R, thus stimulating T_H1 adaptive immunity. Recently, we demonstrated that generation of kinins in peripheral sites of *T. cruzi* infection is preceded by influx of plasma-borne kininogens into interstitial spaces, a leakage response subordinated to TLR2-B₂R activation. Here, we tested if these mechanistic principles also apply to infection by *P. gingivalis*. Gingipain and LPS (an atypical LPS that reportedly acts as a TLR2 ligand) were inoculated, combined or alone, in male BALB/c mice footpads. 3 and 24 h post-inoculation, edema responses were determined. Our results showed that injection of LPS and gingipain alone failed to induce significant edema at the working concentrations. However, when combined, these compounds stimulated potent edema responses which, however, were nullified in TLR2^{-/-} mice, or in wild-type mice pre-treated with HOE-140. We then immunized mice with ovalbumin antigen mixed to LPS/gingipain (alone or combined) and assessed Ag-specific recall responses. Our data confirmed that T_H1 responses were upregulated in WT mice immunized with OVA/gingipain/LPS, but not in HOE-140 treated animals or TLR2^{-/-} mice. In BALB/c, T_H2 polarization was induced upon pre-treatment either with HOE-140 or with gingipain inhibitor. In summary, we demonstrate that gingipain and LPS, acting synergistically, stimulate inflammation and T_H1 responses by activating the TLR2/B₂R axis.

LISTA DE ABREVIATURAS

Áp_{mn} – anticorpo anti-polimorfonucleados
ANOVA – Análise de Variância
Arg - arginina
B₁R – receptor B₁ de cininas
B₂R - receptor B₂ de cininas
BAPNA – N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilidile
BHI – *brain infusion heart broth*
BK – bradicinina
DC – célula dendrítica
ECA/cininase II - enzima conversora de angiotensina
ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
GPCR - proteína G regulatória
HK – cininogênio plasmático de alto peso molecular
i.p. – intraperitoneal
iECA – inibidores da enzima conversora de angiotensina
Ig - imunoglobulina
IL - interleucina
IFN – interferon
IgG2a - imunoglobulinas séricas G2 do tipo a
K - lisina
Kgp – Gingipaína K
LBK - bradicinina
LK - cininogênio plasmático de baixo peso molecular
LPS – lipopolissacarídeo
Lys - lisina
NEP - endopeptidase neutra P
NFκB - Fator Nuclear κB
OVA – ovalbumina
PAMP – padrão molecular associado a patógenos
P. gingivalis – *Porphyromonas gingivalis*
PMN - polimorfonucleados
PRRs - receptores de reconhecimento do patógeno
R - arginina

RgpA – Gingipaína R do subtipo A

RgpB – Gingipaína R do subtipo B

STAT1 - *signal transducer activator of transcription 1*

TCR – receptor de células T

T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*

TGPI-mucina – mucina ancorada por GPI de tripomastigotas de *T. cruzi*

T_H – célula T *helper*

TIMPs - inibidores teciduais de metaloproteinase

TLR – receptor do tipo *Toll*

TLR2^{-/-} - Animais TLR2 knock out, que não possuem o gene para TLR2

WT – *wild type*

LISTA DE FIGURAS

- 1 – Estruturas químicas do lipídeo A produzido pela *E. coli* e *P. gingivalis*.
- 2 - Representação sistemática da estrutura da RgpA, RgpB e Kgp.
- 3 – Capacidade do *T. cruzi* em promover a integração resposta imune inata/adaptativa através de suas moléculas tGPI-mucina e cruzipaína.
- 4 - Edema inflamatório mediado por moléculas de *P. gingivalis* (LPS e gingipaína) é dependente do eixo PMN/gingipaína/B₂R.
- 5 - *Porphyromonas gingivalis* induz resposta edematogênica pela ativação do eixo gingipaína/B₂R.
- 6 - *Porphyromonas gingivalis* induz edema por um mecanismo dependente do eixo TLR2/B₂R.
- 7 - *P. gingivalis* induz produção de IFN- γ por células-T ag-específicas do linfonodo poplíteo via TLR2 e B₂R.
- 8 - *P. gingivalis*, através de suas moléculas LPS e gingipaína, podem ser capazes de promover a integração entre inflamação e imunidade adaptativa através dos receptores TLR2 e B₂R

SUMÁRIO

Folha de Rosto	ii
Ficha Catalográfica	iii
Contra-capá	iv
Folha de Aprovação	v
Agradecimentos	vi
Resumo	viii
Abstract	ix
Lista de Abreviaturas	x
Lista de Figuras	xii
1 Introdução	1
1.1 <i>P. gingivalis</i> e Periodontite Crônica	1
1.2 Atividade Cininogénica da Gingipaína	9
1.3 Cininas: “Sinais de Perigo” Endógenos Capazes de Estimular a Resposta Imune Adaptativa	11
2 Objetivos	16
3 Material e Métodos	17
3.1 Cultura e moléculas de <i>P. gingivalis</i>	17
3.2 Animais	18
3.3 Ensaio edematogénicos	18
3.4 Produção de citocinas	20
4 Resultados	22
5 Discussão	31

1 INTRODUÇÃO

1.1 *P. gingivalis* E PERIODONTITE CRÔNICA

A periodontite crônica é uma doença multifatorial que se caracteriza pela interação entre infecção polimicrobiana da superfície radicular dos dentes/bolsa periodontal e os mecanismos de defesa do hospedeiro. Apesar de muitos conceitos a respeito dessa patologia já estarem esclarecidos, os passos biológicos envolvidos na destruição do ligamento periodontal e osso alveolar ainda não estão completamente entendidos, sendo alvo de estudos recentes (BAKER *et al.*, 1994; PINHEIRO *et al.*, 2003; GIBSON *et al.*, 2004; OKAHASHI *et al.*, 2004; LEONE *et al.*, 2006). Nos casos mais graves, a periodontite crônica pode resultar em perda dentária, sendo esta patologia considerada a principal causa de perda dentária em adultos (SHAW 1987; WILLIAMS 1990).

Algumas bactérias têm sido mais fortemente associadas com a progressão da doença periodontal e vêm sendo chamadas de patógenos periodontais. *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) é um dos principais microorganismos suspeitos de ser agente causador da periodontite crônica (CARLSSON *et al.* 1984b; HOLT *et al.* 1991; SHAH *et al.* 1993; TRAVIS *et al.*, 1997; LEONE *et al.*, 2006; TAKEUCHI *et al.*, 2006). Estudos experimentais em macacos, ratos e camundongos infectados por esse microorganismo comprovam seu papel preponderante na etiologia dessa doença periodontal (CARLSSON *et al.*, 1984; LEONE *et al.*, 2006). Na verdade, *P. gingivalis* é um patógeno intracelular que possui uma variedade de fatores de virulência como fímbrias, polissacarídeo capsular, lipopolissacarídeo (LPS), hemaglutininas (De CARLO *et al.* 1999) e

hemolisinas, além de diversas enzimas proteolíticas que cooperam para a neutralização das linhas de defesa do hospedeiro (TRAVIS *et al.* 1997, OIDOMORI *et al.* 2001).

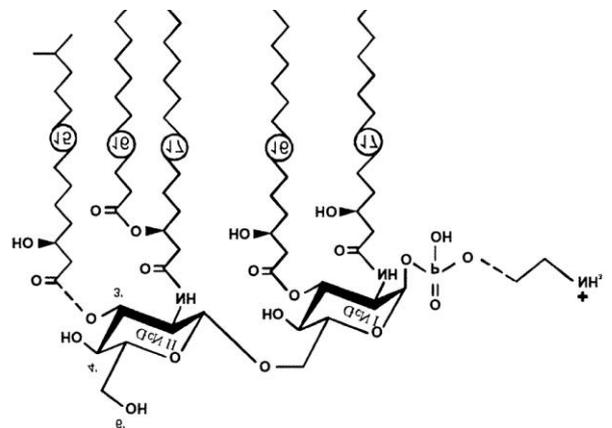
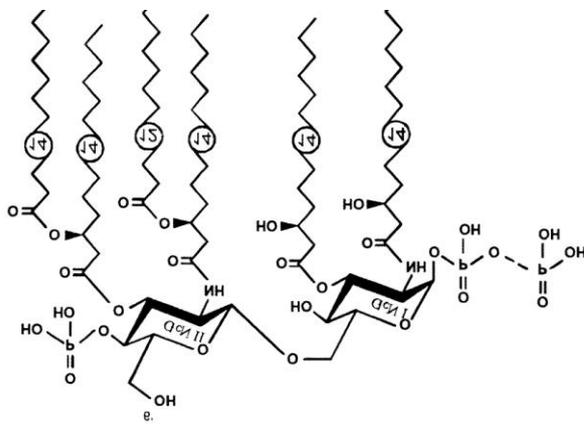
A interação entre *P. gingivalis* e os tecidos e estruturas de seu *habitat* na cavidade oral ocorre, inicialmente, através de estruturas filamentosas presentes em sua superfície. Estas, conhecidas como fímbrias, são importantes fatores de virulência envolvidos na aderência e invasão de células do hospedeiro, particularmente as epiteliais, endoteliais (CHOU *et al.*, 2005) e fibroblastos (DESLAURIERS *et al.*, 1996). As fímbrias também são capazes de estimular no hospedeiro, tanto a resposta imune celular (T_H1) como a humoral (T_H2) (GRAVES *et al.* 2005), já tendo sido demonstrado que a fimbrilina, principal componente da fimbria, é um potente ativador policlonal de células T e B (ISOGAI *et al.*, 1994; DESLAURIERS *et al.*, 1996). Em consequência, procedimentos de imunização com fimbria ou peptídeos sintéticos correspondentes têm se mostrado protetores contra infecção subsequente por *P. gingivalis*. Além disso, estudos em ratos indicam que a inoculação subcutânea de bactérias pode provocar uma indução da resposta imune celular T-específica e produção de anticorpos, principalmente IgG1, contra fímbrias (JOTWANI *et al.*, 2004). As células T-específicas para fímbrias, nesse caso, podem controlar não só a imunorregulação via citocinas, como também a inibição da adesão bacteriana (DESLAURIERS *et al.*, 1996).

Outro fator de virulência importante na etiopatogenia das doenças periodontais, o lipopolissacarídeo (LPS), é um dos principais componentes da parede celular de bactérias gram-negativas. Este é conhecido por causar efeitos diretos no endotélio, induzindo respostas inflamatórias como aumento da

permeabilidade vascular e dilatação de vasos sangüíneos que, por sua vez, proporcionam um meio favorável à atividade de células imunológicas (ENDO *et al.* 1997). *In vivo*, o LPS de *P. gingivalis* foi descrito como sendo cerca de 100 vezes mais tóxico que o LPS de outras bactérias (ROBERTS *et al.*, 1997). Ele se difere bioquimicamente do LPS clássico, derivado das enterobactérias, por possuir heptose e 2-ceto-3-deoxioctonato em sua estrutura (MANSHEIM *et al.*, 1978). Acredita-se que a maior parte das propriedades biológicas do LPS de *P. gingivalis*, especialmente a endotóxica, seja atribuída à porção A do lipídeo, composta por uma única cadeia de ácido graxo considerado o centro bioativo desta molécula. Como ilustrado na **figura 1**, 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 (AIDA *et al.*, 1995). Os sinais secundários e reações intracelulares induzidos por LPS são mediados por receptores do tipo *Toll* (TLRs) que constituem uma família de receptores transmembranares localizados na superfície de diversas células como macrófagos, neutrófilos, mastócitos, células endoteliais, epiteliais, dendríticas e muitas outras. Os TLRs são codificados pelo gene *toll* e possuem um domínio extracelular de leucinas em seqüência e um citoplasmático com seqüência homóloga ao receptor humano de interleucina-1. Até recentemente, 11 TLRs humanos já haviam sido identificados. Dois membros da família TLR (2 e 4) têm sido classificados como possíveis receptores sinalizadores de LPS (SUGAWARA *et al.*, 2000; TABETA *et al.*, 2000). Porém, alguns estudos têm comprovado que o LPS de *P. gingivalis* é capaz de ativar somente o TLR2 que, por sua vez, sinaliza a ativação do Fator Nuclear κ B (NF κ B) levando a indução de citocinas pró-inflamatórias (HAJISHENGALLIS *et al.*, 2002; YOSHIMURA *et al.*, 2002).

Lipídeo A de *Escherichia coli* (*E. coli*)

Lipídeo A de *P. gingivalis*



Lipid A of *Escherichia coli*

Lipid A of *Porphyromonas gingivalis*

Figura 1: Estruturas químicas do lipídeo A produzido pela *E. coli* e *P. gingivalis*. A principal diferença estrutural inclui natureza e número de ácidos graxos, presença ou ausência do segundo fosfato na posição 4' além da substituição da posição do 1-fosfato. (adaptado de AIDA *et al.*, 1995)

O mecanismo pelo qual *P. gingivalis* consegue driblar os mecanismos de defesa do hospedeiro ainda não está completamente esclarecido. Existem evidências, entretanto, que duas proteases bacterianas, gingipaínas R e K (Rgp e Kgp, respectivamente), desempenhem um papel importante nesse processo (KADOWAKY *et al.*, 2000; KISHIMOTO *et al.*, 2006). Liberadas por diversas cepas de *P. gingivalis*, essas enzimas representam 85% da atividade proteolítica e 100% da ação tripsina-símile bacteriana (HOLT *et al.*, 2005). Gingipaínas constituem uma família peculiar de cisteíno-proteases por possuírem seqüências estruturais diferentes de qualquer outra proteína já conhecida. Essa especificidade deve-se à presença de ligações peptídicas entre Arg-Xaa (RgpA e RgpB) ou Lys-Xaa (Kgp). Rgp e Kgp, por sua vez, são sintetizados pelos genes *rgp* e *kgp*, respectivamente (TRAVIS *et al.*, 1997; POTEPA *et al.* 2000). O primeiro tipo, Rgp, cliva substratos protéicos após resíduos de arginina (R) e é a principal protease extracelular de *P. gingivalis* (IMAMURA *et al.*, 1994; TRAVIS *et al.*, 1997), sendo codificada por dois genes similares, *rgpA* e *rgpB*, que darão origem aos RgpA e RgpB, com os respectivos pesos moleculares de 50 e 95kDa (CHEN *et al.*, 1992, PIKE *et al.* 1994). Como observado na **figura 2**, sua fórmula estrutural é composta basicamente por um segmento prepropeptídeo seguido por um domínio catalítico (POTEPA *et al.*, 1998). A RgpA é formada por um complexo não-covalente na região catalítica (**figura 2**) que é gerado por processo proteolítico pelo gene *rgpA*. Além dos domínios já comentados ela possui um domínio a mais, o de hemaglutinina. Já a RgpB é uma enzima de cadeia única contendo apenas uma região catalítica (POTEPA *et al.*, 1995, 1998). O segundo tipo, Kgp, cliva substratos protéicos após resíduos de lisina (K) e possui peso molecular de 105kDa

(PIKE *et al.*, 1994). Sua forma estrutural é semelhante a RgpA diferenciando apenas em alguns segmentos (**figura 2**) (POTEMPA *et al.*, 1995).

As gingipaínas são capazes de impedir a ativação do sistema complemento (SUNDQVIST *et al.*, 1985; SCHENKEIN *et al.*, 1988) e da cascata de coagulação (CARLSSON *et al.*, 1984b; IMAMURA *et al.*, 1995a, 1997, 2001a, 2001b; LOURBAKOS *et al.*, 2001; PINHEIRO *et al.*, 2003), além de inativar inibidores da protease do hospedeiro (CARLSSON *et al.*, 1984a), assim como alterar a atividade de neutrófilos (ODELL *et al.*, 1992; ABE *et al.* 1998; OIDO-MORI *et al.*, 2001), degradar imunoglobulinas (SUNDQVIST *et al.*, 1985), principalmente IgG e IgA e processar fimbriina. Inibidores de cisteíno-proteases como proteínas das famílias das cistatinas, serpinas e inibidores teciduais de metaloproteinase (TIMPs), amplamente distribuídos no hospedeiro, não têm nenhum efeito sobre as Rgp e Kgp, sugerindo que essas duas proteases sejam resistentes ao sistema de defesa do hospedeiro (O'BRIEN-SIMPSON *et al.*, 2001). Elas também são as responsáveis pelas atividades proteolíticas que *P. gingivalis* exerce sobre os tecidos periodontais (TRAVIS *et al.*, 1997; KISHIMOTO *et al.*, 2006). Existem evidências, ainda, que anticorpos específicos para gingipaína sejam produzidos por pacientes com periodontite crônica (INAGAKI *et al.*, 2003; BOOTH *et al.*, 2006), o que comprova que a gingipaína é um fator de virulência da *P. gingivalis* e possível responsável pelas características clínicas da periodontite crônica. De fato, os níveis de gingipaína tendem a aumentar no fluido crevicular quando a doença periodontal está em atividade, o que pode resultar na associação dessas proteases com a progressão da doença (ELEY *et al.*, 1996). Já foi demonstrado, também, que a concentração de gingipaína no fluido gengival diminui significativamente após tratamento periodontal bem sucedido (ELEY *et al.*, 1996). Em decorrência, essas

enzimas têm sido usadas como marcadores em testes clínicos de atividade da doença periodontal, uma vez que seu nível aumentado no fluido crevicular pode indicar uma futura perda de inserção. Além disso, as gingipaínas também estão sendo alvo de estudos para desenvolvimento de vacinas (GIBSON *et al.*, 2001, 2004; YASAKI-INAGAKI *et al.*, 2006) e medicamentos contra a periodontite crônica (GENCO *et al.*, 1999; RAJAPAKSE *et al.*, 2002).

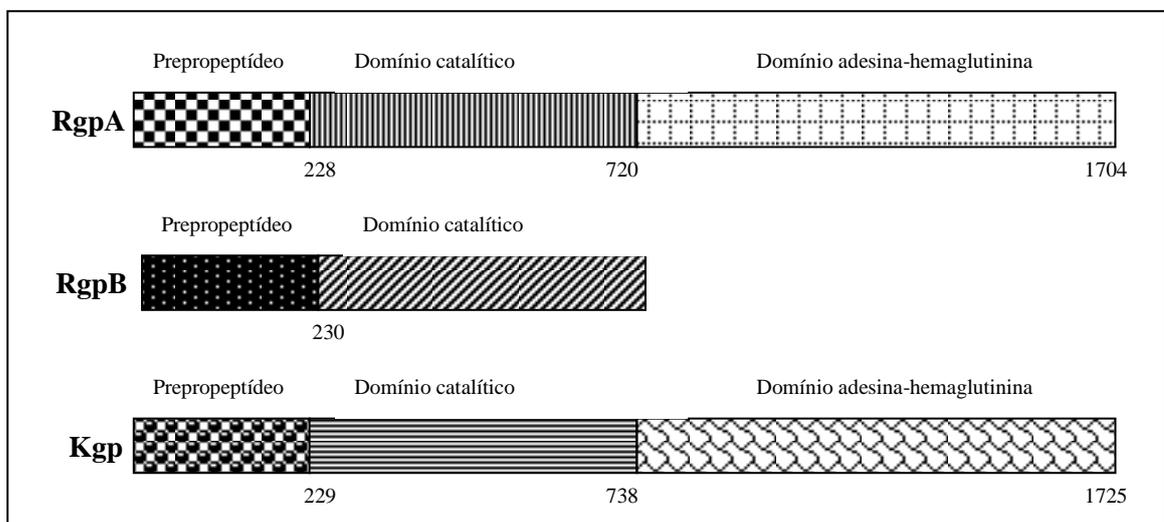


Figura 2: Representação sistemática da estrutura da RgpA, RgpB e Kgp. As regiões de prepropeptídeo e domínio catalítico são semelhantes, porém não idênticos entre as três gingipaínas. Ausência do domínio adesina-hemaglutinina na composição estrutural da RgpB.

1.2 ATIVIDADE CININOGENÁSICA DA GINGIPAÍNA

Além das atividades biológicas anteriormente mencionadas, descreveu-se que a gingipaína também possui atividade cininogenásica (KAMINISHI *et al.* 1993; IMAMURA *et al.*, 1994, 1995b; RUBINSTEIN *et al.* 2001; HU *et al.*, 2006) ao utilizar o cininogênio como substrato para a geração de cininas. As cininas (bradicinina-BK ou lisil-BK) são potentes hormônios peptídicos de meia-vida curta derivados do cininogênio plasmático de alto ou baixo peso molecular (HK/LK). A geração de cininas pode ocorrer tanto na corrente sanguínea como em tecidos periféricos inflamados, através das enzimas caliceínas plasmática e tissular, respectivamente (BHOOLA *et al.*, 1992). Em inflamações crônicas, formas oxidadas de HK são sensíveis à ação combinada de triptase de mastócitos e elastase de leucócitos, resultando na liberação de lisil-BK. A infecção, tanto por bactérias gram-positivas (HERWALD *et al.*, 1996; IMAMURA *et al.*, 2005) ou gram-negativas, como *P. gingivalis* (IMAMURA *et al.*, 1994, 2004a), quanto por protozoários parasitários, como *Trypanosoma cruzi* (Del NERY *et al.*, 1997; SCHARFSTEIN *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2002) e espécies pertencentes ao complexo *Leishmania donovani* (SVENSJÖ *et al.* 2006), promovem a ativação direta do sistema de cininas através de enzimas que clivam cininogênio gerando cininas. Uma vez liberadas, as atividades biológicas das cininas são mediadas por dois receptores distintos, acoplados à proteína G regulatória (GPCRs), os subtipos B₁R e B₂R, ambos membros da subfamília de receptores transmembranares semelhantes à rodopsina (FARMER *et al.*, 1992; BLAUKAT *et al.*, 2003). Além de agir como mediadores pró-inflamatórios, as cininas são, atualmente, consideradas moduladores fisiológicos da homeostase vascular (CAMPBELL, 2003; SCHMAIER, 2004). Como exemplo,

pode-se dizer que baixas concentrações de BK já são suficientes para aumentar a produção de óxido nítrico, protegendo o leito microvascular de injúrias induzidas por reperfusão-isquemia (SHIGEMATSU *et al.*, 1999, 2001), enquanto altos níveis de BK levam ao aumento da inflamação através da indução da agregação de plaquetas e leucócitos e sua aderência ao endotélio (SHIGEMATSU *et al.*, 2002).

O receptor de bradicinina do subtipo B₂ (B₂R) é um receptor constitutivo expresso por uma grande variedade de células, incluindo células endoteliais, musculares, neurônios sensíveis à dor (FARMER *et al.*, 1992; BLAUKAT *et al.*, 2003) e células dendríticas (DCs) imaturas (ALIBERTI *et al.*, 2003). Em contrapartida, a expressão do receptor induzido de bradicinina do subtipo B₁ (B₁R) é geralmente muito baixa ou ausente em tecidos normais. Porém, a expressão desse receptor é aumentada após injúrias teciduais por trauma e/ou inflamação aguda (MARCEAU *et al.*, 1998). A ativação de B₁R depende da clivagem das cininas (BK/LBK) pelas enzimas carboxipeptidase M/N, gerando os ligantes des-Arg-BK ou des-Arg-LBK (DRAGOVIC *et al.*, 1995). Os efeitos agudos decorrentes da formação excessiva de BK/LBK são atenuados pela internalização de B₂R (BLAUKAT *et al.*, 2003, 2003b). Além disso, os efeitos desses hormônios parácrinos são rapidamente regulados através de metalopeptidases, designadas “cininases”, como a endopeptidase neutra P (NEP) ou por ECA/cininase II (enzima conversora de angiotensina) (BHOOLA *et al.*, 1992; SKIDGEL, *et al.*, 2004). Inibidores da ECA (iECA), como captopril e lisinopril, previnem a degradação das cininas, prolongando, dessa forma, sua meia-vida e aumentando seus efeitos fisiológicos.

Em estudos prévios, foi demonstrado que a injeção do *T. cruzi* em patas de camundongos BALB/c pré-tratados com iECA (captopril) foi capaz de gerar um

edema inflamatório potente. A formação desse edema (mediado pelo parasita) não ocorreu em animais deficientes de receptores B₂R de cininas ou aqueles tratados com HOE-140 (antagonista específico de B₂R). Além disso, parasitas pré-tratados com inibidor de cruzipáina (enzima capaz de gerar cininas a partir do cininogênio) também não foram capazes de gerar resposta edematogênica. Embora esses resultados apontassem a cruzipáina como responsável pelo mecanismo de ativação de cininas *in vivo*, a formação do edema não ocorreu em camundongos inoculados com a enzima ativa purificada. Esses resultados indicaram que a atividade proteolítica da cruzipáina “*per se*” não era suficiente para capacitar o parasita com propriedades inflamatórias e estes deveriam depender de co-fatores para ativar esse sistema *in vivo*. Assim, o trabalho demonstrou que a inoculação combinada de tGPI-mucina (molécula inflamatória do *T. cruzi*, ligante de TLR2) e cruzipáina, em camundongos, foi capaz de gerar edema por uma via dependente da ativação de B₂R. Além disso, a formação do edema não ocorreu em camundongos que tiveram suas células polimorfonucleadas depletadas, antes da injeção combinada das duas moléculas ou do parasita. Portanto, concluiu-se que t-GPI-mucina e cruzipáina atuavam cooperativamente, recrutando neutrófilos, para induzir o extravasamento de plasma dependente da via de TLR2/B₂R.

1.3. CININAS: “SINAIS DE PERIGO” ENDÓGENOS CAPAZES DE ESTIMULAR A RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA

As células T CD4⁺ desempenham um papel central no desenvolvimento de respostas imunes. Inicialmente, dois subtipos de células T CD4⁺ foram descritos: um subtipo que participa da ativação de células B promovendo a imunidade humoral (T_H2), e outro subtipo que amplifica a ativação de macrófagos,

promovendo a imunidade celular (T_H1). De acordo com a natureza dos sinais de perigo liberados nos sítios inflamatórios, as DCs adquirem um determinado perfil de secreção de citocinas. Esse perfil, dito polarizante, determinará o desenvolvimento da resposta imune efetora.

As células T_H1 são caracterizadas pela produção de *interferon-gama* ($IFN-\gamma$), uma potente citocina ativadora de macrófagos, sendo essenciais no combate a patógenos intracelulares e na indução da produção de anticorpos do subtipo IgG_{2a} pelas células B. A diferenciação T_H1 é iniciada através de sinais derivados da ativação do TCR e da via de sinalização de STAT1 (*Signal transducer activators of transcription 1*). Dentre as citocinas polarizantes capazes de ativar STAT1, pode-se citar IFN do tipo I ($IFN\alpha$, $IFN\beta$) e II ($IFN\gamma$) e IL-27, cujos receptores estão presentes em células T $CD4^+$ virgens.

As células T_H2 são caracterizadas pela produção de IL-4, IL-5 e IL-13, sendo responsáveis pelo recrutamento de eosinófilos para os sítios inflamatórios e pela indução da produção de IgG_1 e IgE pelas células B. A citocina polarizante IL-4 é responsável por iniciar vias autócrinas positivas e negativas que direcionam o comprometimento com o subtipo T_H2 .

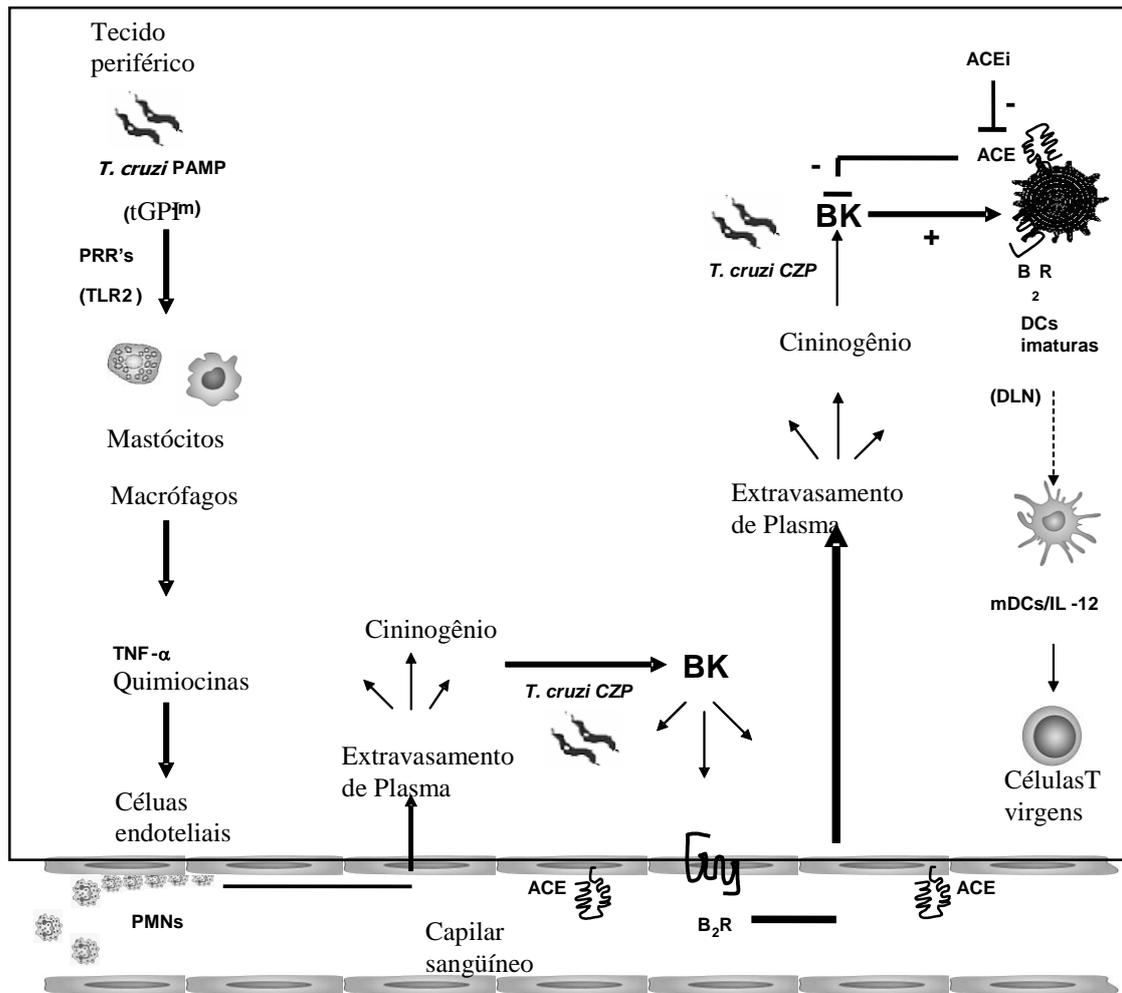
Desde os anos 90, tenta-se delinear o perfil de resposta imunológica linfocitária T_H1/T_H2 (*Thelper1/Thelper2*) na periodontite crônica (OIDO-MORI *et al.*, 2001; GEMMELL *et al.*, 2004). Este interesse se justifica porque o controle para diferenciação de células $CD4^+$ para os eixos T_H1 ou T_H2 é fundamental para se entender os mecanismos imunorreguladores e a maior susceptibilidade de alguns indivíduos em desenvolver esta doença. Na verdade, já há evidências da indução das respostas imunológicas T_H1 e T_H2 na presença de *P. gingivalis* em

camundongos (CHEN *et al.*, 1991) e em humanos, particularmente em pacientes com periodontite crônica (BOOTH *et al.*, 2006). Estudos em camundongos, no entanto, têm sugerido que esta bactéria induz preferencialmente o perfil imunológico T_H1, já que a *P. gingivalis* é um patógeno intracelular (GEMMELL *et al.*, 2004). Além disso, imunoglobulinas séricas G2 do tipo a (IgG2a) são predominantes na resposta do hospedeiro frente à infecção bacteriana crônica, o que confirma envolvimento de células características do perfil T_H1. Estas células, por sua vez, podem estar associadas com o aumento da susceptibilidade à perda óssea após infecção por *P. gingivalis* (GEMMELL *et al.*, 2004). Já foi reportado que cininas endógenas induzem a maturação de DCs através da estimulação de seus receptores de cininas do subtipo B₂ (MONTEIRO *et al.*, 2006), sugerindo que cininas funcionam como sinais de “perigo” endógenos (MATZINGER, 2002), polarizando a resposta imune adaptativa T_H1 via IL-12.

Estudos recentes verificaram que BK/LBK exógenas são capazes de converter DCs imaturas em indutores da resposta imune T_H1 através da ativação de B₂R (ALIBERTI *et al.*, 2003). Dessa forma, as cininas podem então ser reconhecidas como sinais de “perigo” endógenos, induzindo a maturação/diferenciação de DCs (MATZINGER *et al.*, 2002). Durante uma infecção, discute-se se a geração indireta de sinais de “perigo” endógenos como, por exemplo, cininas (ALIBERTI *et al.*, 2003), ATP (SCHNURR *et al.*, 2000), proteínas de choque térmico (SRIVASTAVA 2002), ácido úrico (SHI *et al.*, 2003) e endovanilóides (BASU *et al.*, 2005) são capazes de converter DCs em células apresentadoras profissionais indutoras da imunidade adaptativa (SPORRI *et al.*, 2005), já que os patógenos agem diretamente ativando os receptores de reconhecimento do patógeno (PRRs), como os receptores do tipo *toll* (TLR) (IWASAKI *et al.*, 2004). Esse questionamento foi recentemente

analisado utilizando-se um modelo murino de infecção subcutânea pelo *Trypanosoma cruzi*, parasita intracelular causador da “Doença de Chagas”. No contexto da inflamação/resposta imune, Monteiro e colaboradores (2006) propuseram um modelo inflamatório mediado por ligantes de receptores do tipo TLR2 e cininas geradas pela ação da cruzipaina do *T. cruzi* como ilustrado na **figura 3**.

Portanto, a questão central em relação à infecção por *P. gingivalis* seria sua capacidade em ativar mecanismos inflamatórios e imunológicos similares aos propostos para o *T. cruzi*. A abordagem dessa questão se justifica pela conhecida homologia estrutural e funcional entre cruzipaina e gingipaina, respectivos fatores de virulência do *T. cruzi* e da *P. gingivalis*.



Adaptado MONTEIRO *et al.*, 2006.

Figura 3: Capacidade do *T. cruzi* em promover a integração resposta imune inata/adaptativa através de suas moléculas tGPI-mucina (tGPI-m) e cruzipaina (CZP). Após infecção por *T. cruzi*, o padrão molecular associado ao patógeno (PAMP)-tGPI-mucina ativaria receptores do tipo TLR2 expresso por macrófagos, mastócitos ou células residentes do tecido infectado, estimulando a secreção de quimiocinas inflamatórias (eg. MIP-2) ou citocinas (eg. TNF-α). Estas, por sua vez, estimulariam um pequeno extravasamento de plasma e seus constituintes, como o cininogênio. Uma vez liberado, o cininogênio seria clivado em BK pela cruzipaina (cisteíno-protease do *T. cruzi*). Esta cinina amplificaria a inflamação ao estimular células endoteliais via receptores B₂R, promovendo um maior extravasamento de plasma e cininogênio (*feedback* positivo). Células dendríticas imaturas que também expressariam receptores B₂R ao se ligarem à BK, iniciariam o processo de maturação e estimulariam a diferenciação de células T CD4⁺ virgens para o eixo T_H1 através de uma via dependente de IL-12 p70 (MONTEIRO *et al.*, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Testar a hipótese de que cininas endogenamente liberadas em tecidos periféricos infectados por *P. gingivalis* são capazes de promover a integração entre inflamação e imunidade adaptativa, via receptores TLR2/B₂R.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a participação da gingipaína (liberadora de cininas) na geração da resposta edematogênica via ativação dos receptores de cininas do subtipo B₂
- b) Determinar se os receptores inatos TLR2 participam da resposta inflamatória edematogênica induzida pelo LPS de *P. gingivalis*
- c) Investigar o efeito cooperativo entre gingipaína e LPS (ligante de TLR2) na ativação da cascata de bradicinina *in vivo*
- d) Verificar o perfil de resposta imune adaptativa (tipo 1 ou 2) gerada pela ativação do eixo TLR2-B₂R via gingipaína e LPS.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTURA E MOLÉCULAS DE *P. gingivalis*

P. gingivalis da cepa W83 foram gentilmente doadas pelo laboratório de Microbiologia Oral – Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes - UFRJ. De forma simplificada, a bactéria cresceu em meio de cultura (ágar-san

gue) por duas semanas. Os valores da biomassa foram estimados pela densidade óptica a 660nm de amostras de cultura e do peso celular ao fim do experimento. Para ser injetada em camundongos, a bactéria cresceu em meio líquido BHI (*brain infusion heart broth*) suplementado com 0,5% de extrato de levedura, 5µg de hemina, 0,5µg/ml de vitamina K e 0,1% de cisteína. A cultura líquida foi incubada por sete dias a 37°C em câmara anaeróbica com 10% H₂, 10% CO₂ e 80% N₂ (POTEMPA *et al.*, 1998).

A gingipaína RgpB, o inibidor de cisteíno-proteases (N-1065 H-D-Phe-Pro-Arg-Chlorometilketone), LPS e fímbrias (*P.gingivalis* fimbriac) foram gentilmente doados pelo Professor Jan Potempa (*Institute of Molecular Biology, Jagiellonian University, Poland*). Resumidamente, a purificação das cisteíno-proteases foi realizada da seguinte forma: o meio líquido contendo *P. gingivalis* sofreu precipitação após adição de acetona e o pellet foi redissolvido em 20mM Bis-Tris, 150mM NaCl, 0,02% NaN₃ pH 6.8 contendo 1,5mM 4,4'-dissulfato de ditropiridina. A solução foi, então, dialisada e a fração centrifugada 40000g/2h, concentrada por ultrafiltração e colocada em uma coluna Sephadex G-150 equilibrada com tampão Bis-Tris/NaCl. A coluna foi lavada e frações (5mL) tinham suas atividades analisadas por BAPNA. As frações com maior atividade foram agrupadas, dialisadas e colocadas em colunas de arginina-sefaroze (1,5X30cm, 50mL) equilibrada com 50mM Tris, 1mM CaCl₂ pH 7.4, e 0,02% NaN₃. A coluna foi lavada com tampão até

a atividade aferida pelo BAPNA se mantivesse abaixo de 20 MOD/min/ μ L e a enzima restante colocada em 0,5M NaCl. Diferentes formas de gingipaína R2 foram obtidas por cromatofocagem em coluna mono-P (Pharmacia-fast protein liquid chromatographic system) equilibrada com 25mM Bis-Tris pH 6.3 utilizando um gradiente de pH desenvolvido com 50mM de Polybuffer 74 (Pharmacia) 10X diluída e pH ajustado para 4.0. (POTEMPA *et al.*, 1998).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados nestes experimentos, aproximadamente, 200 camundongos BALB/c machos, C57BL/6 WT (TLR2^{+/+}) e C57BL/6/TLR2^{-/-}, com peso médio entre 25 a 35g, de quatro a seis semanas, mantidos em temperatura controlada de 22 \pm 2°C, com ciclo de claro/escuro de 12 horas com livre acesso à água e ração, ambos autoclavados. Todos os procedimentos realizados nestes animais foram aprovados pela Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa (CAUAP/IBCCF/UFRJ) número 056-05-2006 (ANEXO).

A colônia de camundongos C57BL/6/TLR2^{-/-}, foi mantida no Laboratório de Animais Transgênicos (LAT) localizado na Bio Rio e pertencente ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) - UFRJ.

3.3 ENSAIOS EDEMATOGÊNICOS

Foram injetados na pata traseira esquerda dos camundongos 10 μ L de uma solução contendo gingipaína-RgpB (7,5 nM), LPS (10nM), cisteína (10nM), e 15nM de inibidor de gingipaína (H-D-Phe-Pro-Arg-clorometilcetona) em PBS estéril e livre de LPS, distribuídos em diferentes combinações, de acordo com os grupos (LPS; RgpB; RgpB + LPS; HOE-140 + RgpB + LPS; RgpB + inibidor + LPS), ou 10⁴ de *P.*

gingivalis W83 (*P. gingivalis*; HOE-140+ *P. gingivalis*; *P. gingivalis* + inibidor de gingipaína) em solução tampão (CaCl₂ 0,005M; Tris-HCl 0,05M; NaCl 0,15M; Cys 0,005M diluídos em água apirogênica). Como controle, a pata contra lateral recebeu o mesmo volume somente de PBS (quando se inoculava as moléculas) ou tampão (quando a inoculação era bacteriana). As concentrações determinadas para *P. gingivalis*, RgpB e LPS foram baseadas em experimentos pilotos e pelos experimentos anteriormente realizados com *T. cruzi*, cruzipaína e TGPI-mucina.

Para bloquear a resposta via B₂R por 24 horas, 100µg/kg de HOE-140 (Aventis Pharmaceuticals, Bridgewater, NJ) foram injetados subcutaneamente 1 hora antes da inoculação da bactéria ou moléculas.

Com o objetivo de prolongar a meia-vida da bradicinina, alguns grupos receberam inibidor da enzima conversora de angiotensina (iECA-Captopril) intra-periotoneano (4mg/Kg), 1 hora antes da inoculação nas patas.

Para analisar o desenvolvimento do edema na ausência de polimorfonucleares, um grupo de 5 animais recebeu anticorpo anti-polimorfonucleados (ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION) (450µL/animal 10 vezes diluído em PBS) pela via intra-periotoneana 24 horas antes da inoculação das moléculas de *P. gingivalis* nas patas.

Os ensaios de medição de edema de pata foram realizados conforme descrição prévia por Todorov e colaboradores (2003). Cada grupo mencionado anteriormente era composto por 5 animais. O curso da formação do edema atingiu seu pico inicial 3 horas após a infecção com moléculas/ bactérias nas patas. Após este tempo, o volume destas foi aferido através de um sistema em que uma bomba peristáltica garante o fluxo contínuo de um líquido. Admite-se que o volume de líquido deslocado pelo espaço ocupado pela pata em um dado intervalo de tempo é

igual ao volume da pata do camundongo. A diferença entre o volume da pata inoculada (esquerda) e volume da pata controle (direita) é a medida do edema gerado. Todos os resultados representam pelo menos dois experimentos independentes e cada grupo foi constituído por cinco animais. As prováveis diferenças estatísticas entre os valores da média de cada grupo foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA) com $p < 0,05$.

Cada experimento foi repetido 3 vezes e cada grupo era constituído de 5 animais.

3.4 PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Para verificar qual o tipo de resposta imune adaptativa (T_H1 ou T_H2) foi ativado em virtude do processo inflamatório inicial, injetou-se nas duas patas de camundongos BALB/c, 30 μ L de uma solução contendo gingipaína-RgpB (7.5 nM) e LPS (10 nM) associadas, ou não, ao inibidor de gingipaína (N-1065 H-D-Phe-Pro-Arg-Chlorometilketone - 30nM), emulsionadas em adjuvante (Alum 25mg/pata ou Freund completo 25 μ L/pata) e antígeno Ovalbumina-OVA livre de LPS (50 μ g/pata). Oito dias após a imunização, foi dado um reforço nas duas patas traseiras com OVA (20 μ g/pata) e um veículo (PBS), ambos livres de LPS. Oito dias após o reforço, os animais foram sacrificados e os linfonodos drenantes (poplíteos) das duas patas removidos e imediatamente colocados em meio RPMI 1640 completo (1mM de piruvato de sódio, 2mM de glutamina, 0,05mM de α - β mercaptoetanol e 10% de soro fetal bovino inativado). Após centrifugação a 400g por 10 minutos, as células foram ressuspensas em meio RPMI completo, colocadas em placas de 96 poços com 1×10^6 células/poço, estimuladas ou não com o antígeno OVA (25 μ g/animal) e incubadas em estufa a 37°C por 72 horas. Os níveis de IFN- γ (T_H1) e IL-4 (T_H2) foram quantificados nos

sobrenadantes dessas células por ELISA, de acordo com as instruções do fabricante (Techniques for Immune Function Analysis Application Handbook 1st Edition. www.bdbiosciences.com/immune_function). Resumidamente, anticorpos monoclonais utilizados para captura dessas citocinas foram plaqueados em placa de ELISA com 96 poços (4µg/mL, 50µL/poço) em temperatura ambiente por 12 h. Os poços, então, foram bloqueados com solução tampão de PBS-BSA 1% (300µL/poço) por 2 horas em temperatura ambiente. Após lavagem dos poços com PBS-Tween 0.1%, as amostras-padrão e os sobrenadantes das células foram plaqueadas por 2 horas em temperatura ambiente. Após lavagem, anticorpos monoclonais biotinilados (detecção) foram adicionados à placa (400ng/mL) por 2 horas em temperatura ambiente. Após lavagem, o substrato (TMB substrate reagent-BD Biosciences) foi, então, adicionado aos poços (50µL/poço) e incubado por 20 minutos em temperatura ambiente e na ausência de luz. A reação foi interrompida com solução de H₂SO₄ e as placas lidas em um leitor de ELISA à 405nm.

4 RESULTADOS

No presente trabalho, propôs-se investigar se a gingipaína (enzima capaz de gerar cinina) e LPS de *P. gingivalis* (LPS atípico ligante de TLR2) seriam capazes de ativar a cascata das cininas *in vivo* por um mecanismo dependente da ativação de B₂R. Assim, gingipaína e LPS de *P. gingivalis* foram injetados, isolados e concomitantemente, em animais BALB/c e as alterações nos volumes das patas foram medidas pelo método volumétrico, conforme descrito anteriormente. Nenhuma resposta edematogênica significativa foi observada quando gingipaína e LPS foram injetados separadamente (**Figura 4**). Entretanto, a formação de um edema potente foi observada 3 horas após a inoculação das duas moléculas combinadas, e o pré-tratamento dos camundongos com HOE-140 diminuiu essa resposta inflamatória (**Figura 4**). Além disso, o tratamento prévio da enzima com o seu inibidor específico (H-D-Phe-Pro-Arg-clorometilcetona) também foi capaz de bloquear a geração do edema (**Figura 4**). Um grupo de animais foi pré-tratado (18 horas antes da inoculação das moléculas) com um anticorpo anti-polimorfonucleados e os resultados demonstraram que esta depleção interferiu no extravasamento de plasma e inibiu o processo inflamatório mediado por LPS e gingipaína (**Figura 4**).

Para testar a capacidade da *P. gingivalis* em ativar o sistema de cininas *in vivo*, as bactérias foram injetadas nas patas traseiras dos animais e a mudança do volume foi mensurada após 3 horas. O grupo de animais que foi infectado com as bactérias (10⁴/pata) desenvolveu edema significativo (**Figura 5**). Em contrapartida, não foi observada resposta edematogênica em animais pré-tratados com HOE-140 (antagonista específico de B₂R), tão pouco em animais que receberam bactérias pré-tratadas com o inibidor de gingipaína (H-D-Phe-Pro-Arg-clorometilcetona).

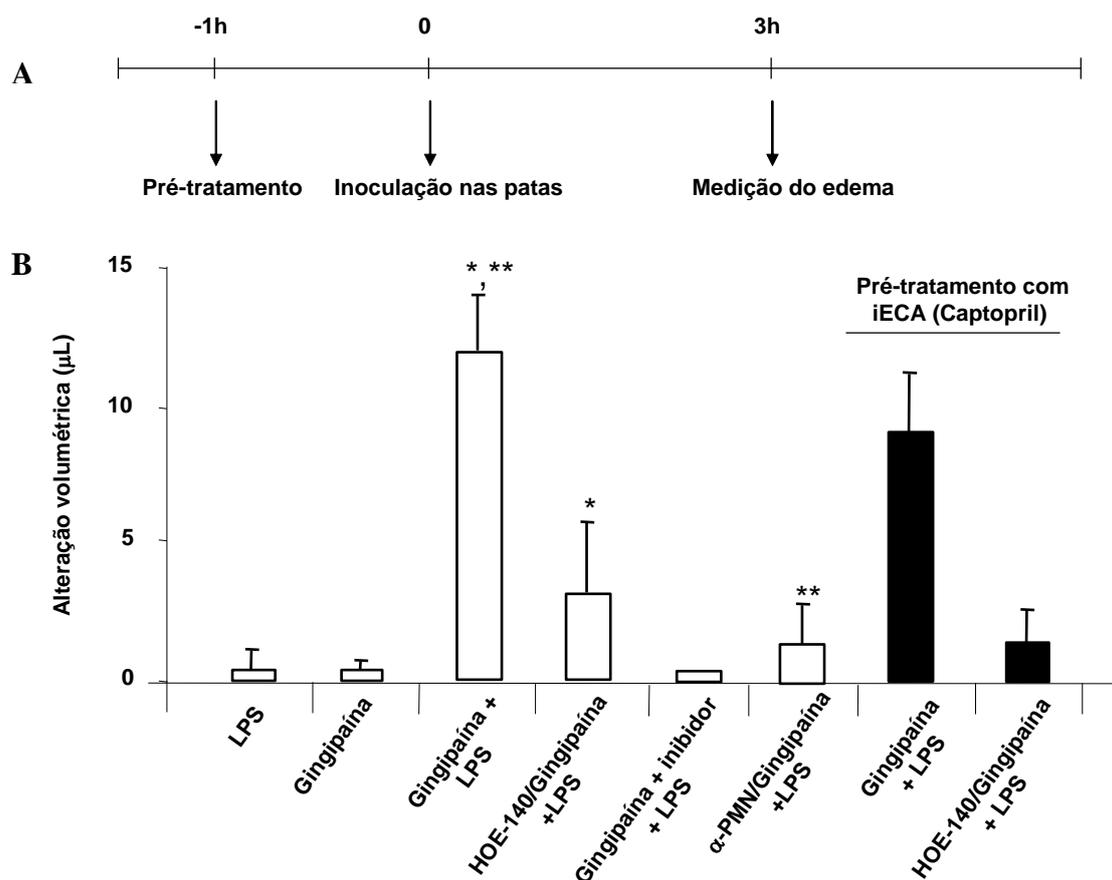


Figura 4: Edema inflamatório mediado por moléculas de *P. gingivalis* (LPS e gingipaína) Edema (3h) induzido por injeção contendo 7,5 nM de gingipaína (RgpB) ativada e 10nM de LPS, separadas ou concomitantemente, em patas de camundongos BALB/c machos, pré-tratados ou não com iECA (10mg/Kg, i.p.) na presença ou ausência de HOE-140 (100µg/Kg, s.c.). **(A)** Linha de tempo do experimento. Como controle, PBS foi injetado nas patas contralaterais. Um grupo de animais foi inoculado com uma solução contendo RgpB inativada com 21nM de inibidor de cisteíno-protease (H-D-Phe-Pro-Arg-clorometilcetona) e 10 nM de LPS **(B)**. Um outro grupo foi pré-tratado com anticorpo anti-PMNs 18 h antes da inoculação da enzima e LPS. Alterações no volume das patas foram aferidas 3 horas após a inoculação das moléculas. Os resultados representam 3 experimentos independentes (n=5). Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA seguido por pós-teste de Tukey. * e ** representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

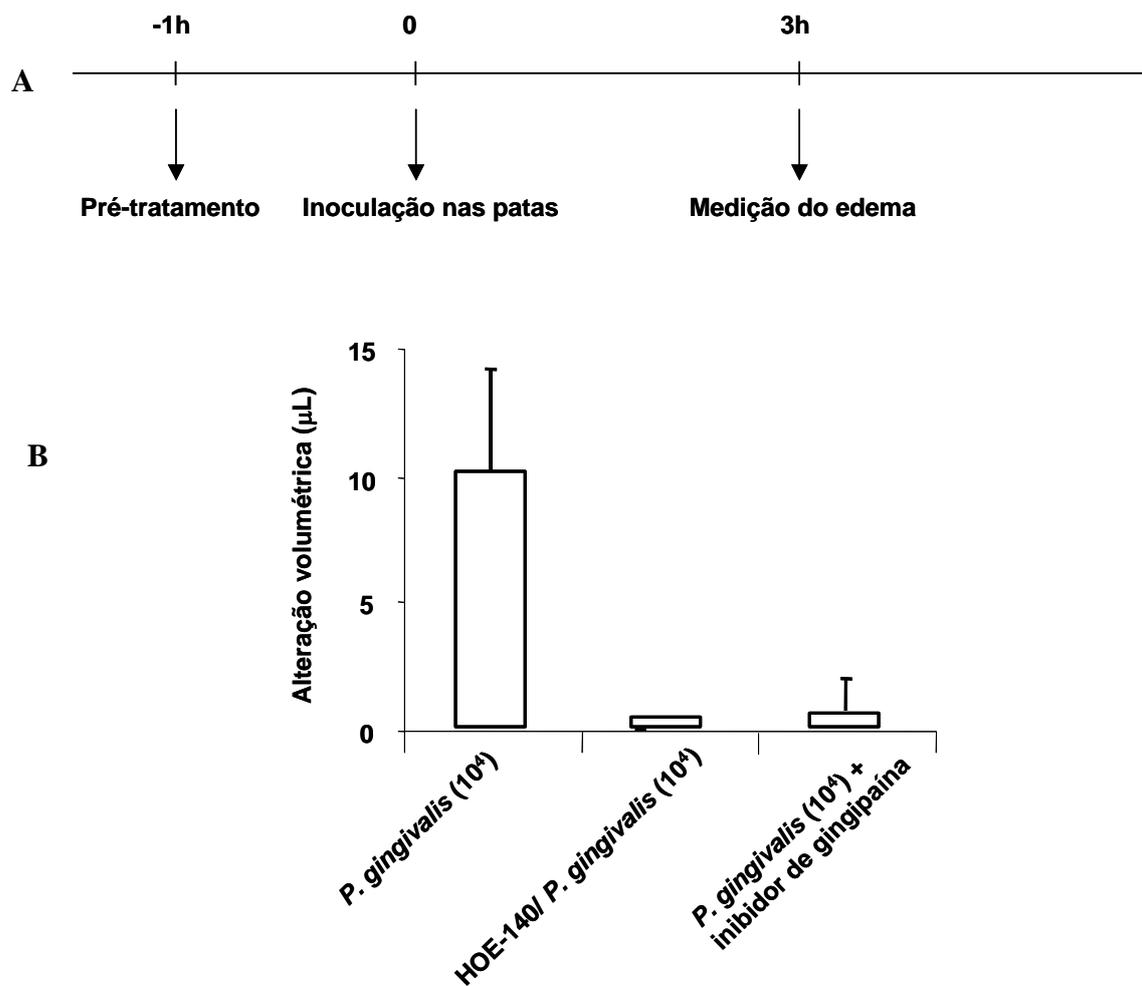
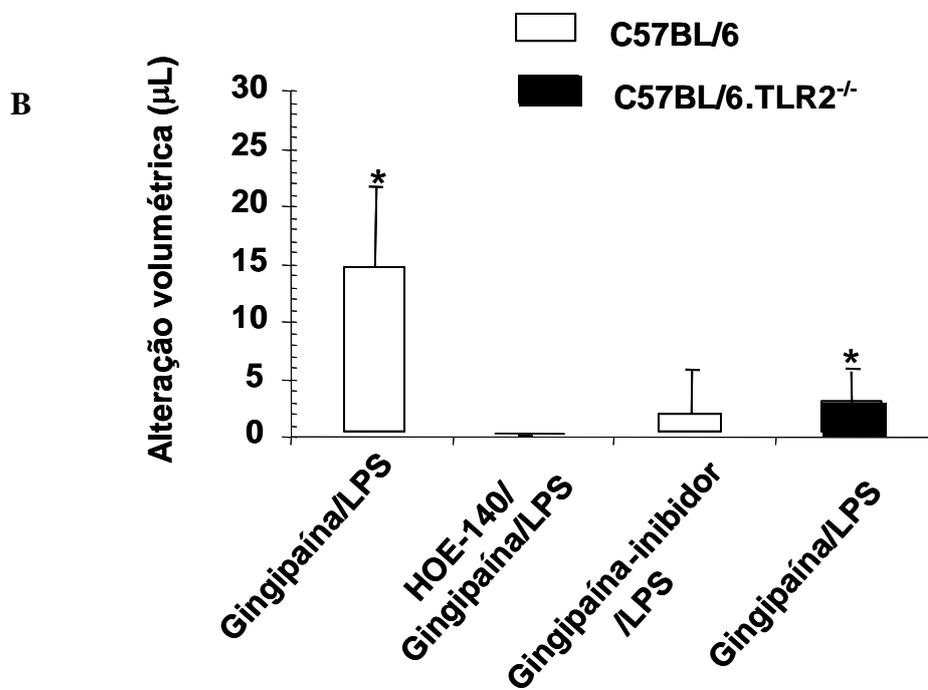
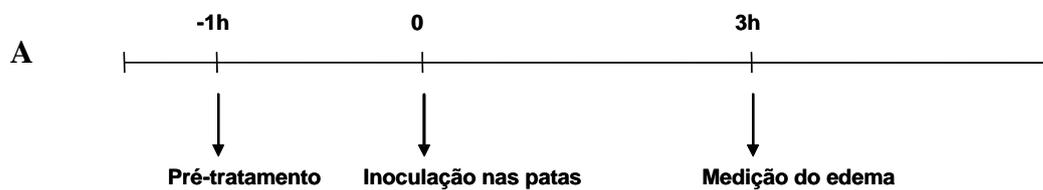


Figura 5: *Porphyromonas gingivalis* induz resposta edematogênica pela ativação do eixo gingipaína/B₂R. Edema induzido por inoculação de 10⁴ de *Porphyromonas gingivalis* em patas de camundongos BALB/c pré-tratados ou não com HOE-140 (100µg/Kg, s.c.) 1 hora antes da injeção. (A) Linha de tempo do experimento. Como controle, PBS foi injetado nas patas contralaterais. Um grupo de animais foi infectado com *Porphyromonas gingivalis* inativada previamente com inibidor de cisteíno-protease (H-D-Phe-Pro-Arg-clorometilcetona) (B). Alterações volumétricas nas patas foram aferidas 3 horas após inoculação (n=5). Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA seguido por pós-teste de Tukey ($\rho < 0,05$).

Considerando o modelo proposto na infecção por *T. cruzi*, investigou-se, nesse trabalho, a participação do receptor TLR2 no processo inflamatório mediado por LPS e gingipaína de *P. gingivalis*. Camundongos C57BL/6 inoculados com LPS/gingipaína e *P. gingivalis* desenvolveram potente edema, sendo ambas as situações bloqueadas pelo pré-tratamento dos animais com HOE-140. Entretanto, o edema inflamatório foi

notadamente reduzido nos animais deficientes nos receptores do tipo TLR2 (TLR2^{-/-}) que foram inoculados com as moléculas ou bactérias (**Figura 6**). Além disso, os animais selvagens que receberam a gingipaína ou a bactéria, pré-tratadas com o inibidor da gingipaína (H-D-Phe-Pro-Arg-clorometilcetona), também não desenvolveram edema (**Figura 6**). Esses resultados sugerem que LPS e gingipaína atuam cooperativamente induzindo a comunicação entre TLR2 e B₂R através de um mecanismo dependente de neutrófilos.



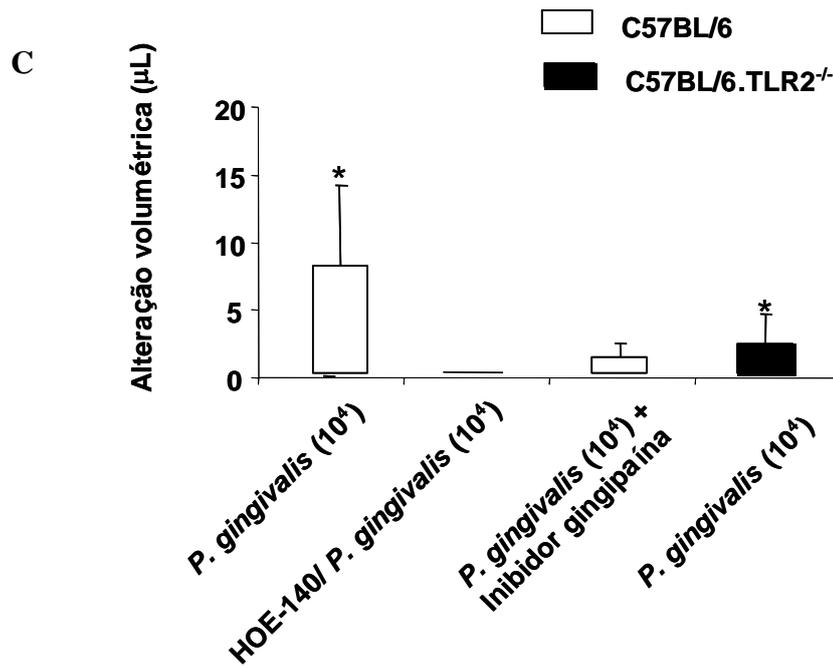
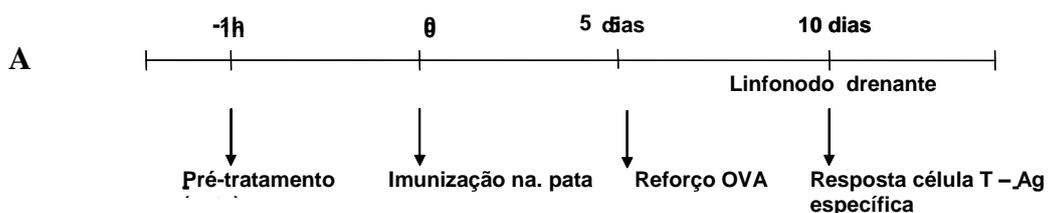


Figura 6: *Porphyromonas gingivalis* induz edema através de um mecanismo dependente do eixo TLR2/B₂R. (A) Linha de tempo do experimento. Edema induzido em patas de camundongos C57BL/6 TLR2^{+/+} e C57BL/6 TLR2^{-/-}, após a inoculação de gingipaína (7,5nM) em combinação com LPS (10nM) (**Gráfico B**), ou *P. gingivalis* (10⁴) (**Gráfico C**), na presença ou ausência de HOE-140 (100µg/Kg, s.c.) 1 hora antes da injeção. Grupos de animais foram inoculados com gingipaína (7,5nM) (**Gráfico B**) ou *P. gingivalis* (**Gráfico C**), pré-tratadas com inibidor de cisteíno-protease (20nM). As alterações no volume das patas foram aferidas 3 horas após a inoculação. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes (n=5). Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA seguido por pós-teste de Tukey.* representa $p < 0,05$.

Após a caracterização do papel dos receptores TLR2 e B₂R na dinâmica da resposta inflamatória, verificou-se se esses eventos tinham impacto sobre os mecanismos da modulação da resposta imune adaptativa. Utilizando o modelo de injeção subcutânea, camundongos foram imunizados com gingipaína e LPS da *P.*

gingivalis em emulsão de alumem (hidróxido de alumínio) contendo ovalbumina (OVA) como antígeno. Células T totais dos linfonodos drenantes (linfonodos poplíteos) foram isolados e estimulados *in vitro* com OVA por 72 horas. A dosagem de citocinas T_H1 e T_H2 (IFN- γ e IL-4 , respectivamente) produzidas *in vitro* após o estímulo secundário com o antígeno mostrou que houve uma produção expressiva de IFN- γ no grupo de animais que haviam sido imunizados com gingipaína, LPS e OVA (**Figura 7**). Entretanto, os resultados demonstraram uma queda significativa na produção de IFN- γ pelo grupo de animais que fora tratado previamente com HOE-140 1 hora antes da imunização completa (gingipaína/LPS/OVA), ou que foram imunizados com gingipaína pré-tratada com inibidor de cisteíno-protease/LPS/OVA (**Figura 7**). O grupo controle imunizado com LPS e OVA produziu níveis semelhantes de IFN- γ ao grupo imunizado somente com OVA em alumem (**Figura 7**). Conforme observado anteriormente, (determinação da resposta edematogênica mediada pela *P. gingivalis* ou suas moléculas, gingipaína e LPS), a imunização dos animais com essas moléculas associadas à OVA na ausência do inibidor da ECA (captopril), foi suficiente para a modulação da resposta imune para o eixo T_H1 (**Figura 7**). Além disso, a análise da produção de IL-4 mostrou que ocorre uma modulação da resposta imune adaptativa para o eixo T_H2 pelos grupos de animais tratados previamente com HOE-140 ou que foram imunizados com gingipaína pré-tratada com inibidor de cisteíno-protease (**Figura 7**).



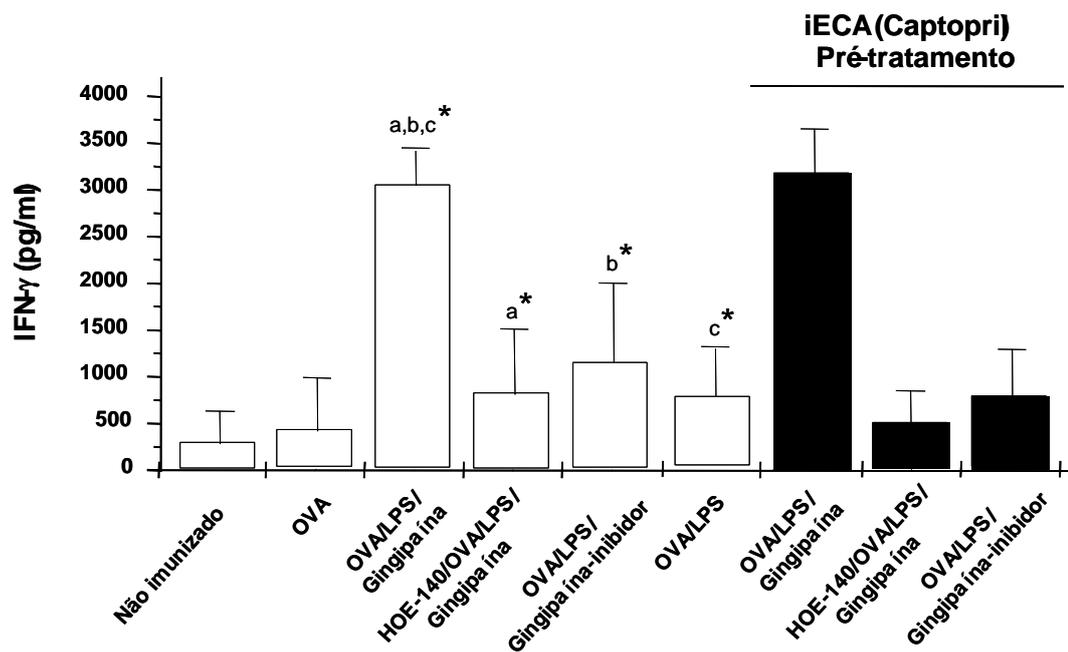
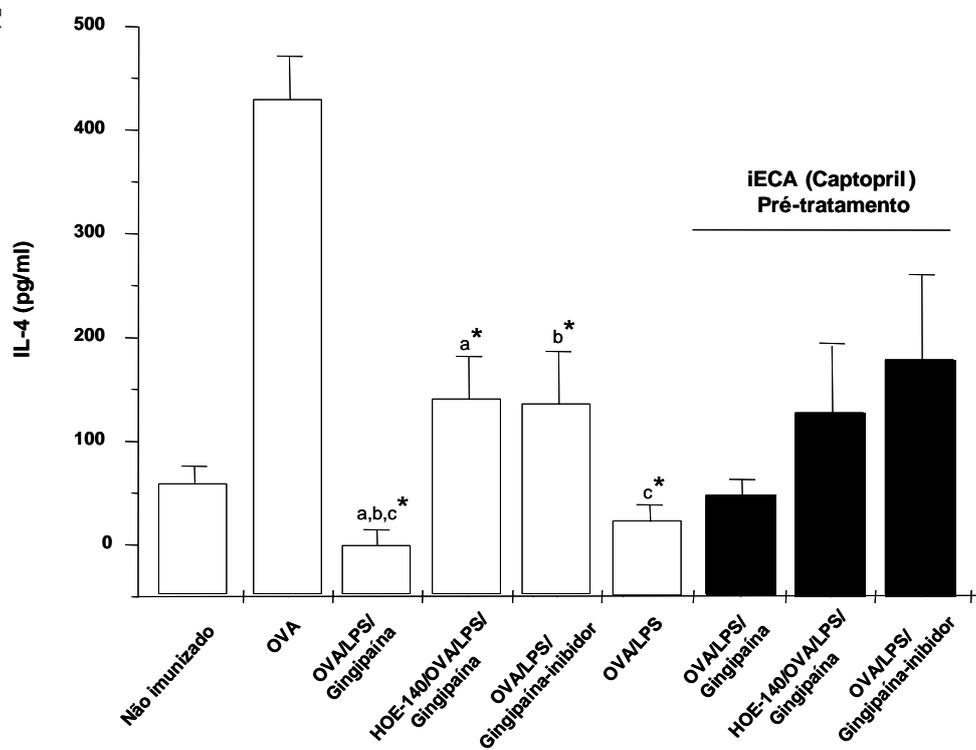
B**C**

Figura 7: *P. gingivalis* induz produção de IFN- γ por células-T ag-específicas do linfonodo poplíteo via TLR2 e B₂R. (A) Linha de tempo do experimento. Quantificação de IFN- γ (Gráfico B) e IL-4 (Gráfico C) produzidos por células T de linfonodos poplíteos (drenantes) isoladas de camundongos BALB/c imunizados com LPS de *P. gingivalis* (10 nM), gingipaína/RgpB (7,5 nM) e Ovalbumina (OVA Ag) (50 μ g/mL) adsorvidos em alumem (hidróxido de alumínio). Os animais receberam ou não pré-tratamento com iECA (10mg/Kg, i.p), na presença ou ausência de HOE-140 (100 μ g/Kg, s.c.), 1 hora antes da imunização. 8 dias após a imunização, os animais receberam um reforço com OVA Ag (10 μ g/mL). Células T totais dos linfonodos drenantes foram isoladas 8 dias após reforço e estimuladas *in vitro* com OVA (10 μ g/mL) por 72 horas a 37°C. Os níveis de IFN- γ e IL-4 nos sobrenadantes das células estimuladas foram determinados por ELISA. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes com resultados similares (n=5). Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA seguido por pós-teste de Tukey * ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Esse estudo fornece subsídios para melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no reconhecimento de *P. gingivalis* e na resposta imunológica desenvolvida pelas células do hospedeiro. O modelo de infecção subcutânea, apresentado nesse trabalho, promove um paradigma sobre a cooperação entre TLR2 e B₂R como sinalizadores efetivos da inflamação. Foi demonstrado, nesse estudo, que a ativação de TLR2 é crítica para a geração de BK, possivelmente através do influxo do cininogênio plasmático para o local da infecção.

O edema localizado é uma importante característica da inflamação e conseqüente do aumento da permeabilidade vascular, desregulação da hemodinâmica regional e amplificação da injúria tecidual. A participação da via de cininas no desenvolvimento de respostas imunes induzidas por *Porphyromonas gingivalis* ainda não havia sido explorada. A gingipaína parece ser a única enzima de *P. gingivalis* capaz

de ativar a cascata das cininas, tendo como produto final a bradicinina, essencial na indução da permeabilidade vascular (IMAMURA *et al.*, 1994). No caso da periodontite, os eventos descritos seriam traduzidos em aumento do fluido gengival local, contração da musculatura lisa, dilatação arteriolar, quimiotaxia de células inflamatórias e dor, além da ativação da fosfolipase A2 (KAMINISHI *et al.*, 1993; McGRAW *et al.*, 1999; HOLT *et al.*, 2005; HU *et al.*, 2006).

Sabe-se que o LPS bacteriano é uma estrutura de importância fundamental para iniciar as respostas inflamatória e imunológica do hospedeiro. Já foi comprovado que o LPS de muitas espécies bacterianas patogênicas, como enterobactérias, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum* é um ligante típico de TLR4. Porém, estudos *in vitro* indicam que o LPS de *P. gingivalis* não se liga ao TLR4 (HIRSCHFELD *et al.*, 2001), mas sim ao TLR2 (HAJISHENGALLIS *et al.*, 2002; YOSHIMURA *et al.*, 2002). Isso faz com que o lipopolissacarídeo dessa espécie bacteriana receba o nome de “LPS atípico”. Alternativamente, alguns microcomponentes dessa bactéria podem inibir a ativação via TLR4 (YOSHIMURA *et al.*, 2002).

Foi investigado, no presente trabalho, se a geração de cininas induzidas através da infecção pela bactéria em tecidos periféricos, promove a integração entre inflamação e resposta imune adaptativa. Após demonstrar a importância da cooperação entre TLRs e B₂R na dinâmica da resposta inflamatória, verificou-se que o TLR2, estimulado pelo LPS, induziu o extravasamento de plasma, o que indiretamente aumentou os níveis de cininas sinalizadoras de “perigo” após infecção por *P. gingivalis* ou suas moléculas, gingipaína e LPS, no tecido periférico.

No modelo de infecção subcutânea pelo *T. cruzi*, o pré-tratamento dos camundongos com iECA (captopril), visando aumentar a meia-vida das cininas, é

essencial para a visualização da formação do edema (MONTEIRO *et al.*, 2006). Entretanto, nesse modelo, a determinação da resposta inflamatória não se mostrou dependente deste pré-tratamento (**Figura 4**).

A ativação dos receptores TLR2 e o recrutamento de PMNs são essenciais para a ativação do sistema das cininas. O estudo da dinâmica da resposta inflamatória sugere que TLR2 exerce um “papel-chave” para o início e/ou propagação do extravasamento plasmático. Esta hipótese foi verificada no momento em que injeção contendo LPS/gingipaína em camundongos TLR2^{-/-} provocou um edema atenuado, quando comparado às respostas observadas nos animais C57BL/6 selvagens. O LPS e a gingipaína também não induziram edema em camundongos BALB/c que tiveram seus PMNs depletados. Além disso, observou-se que o edema mediado por LPS/gingipaína ou *P. gingivalis* não ocorreu em animais (C57BL/6 ou BALB/c) tratados previamente com HOE-140 (antagonista de B₂R) uma hora antes de receberem a injeção. Esses resultados sugerem que LPS e gingipaína agem cooperativamente induzindo a ativação de TLR2/B₂R por um mecanismo dependente de neutrófilos.

O presente trabalho analisou *in vivo* o desenvolvimento da resposta imunológica após a inoculação de *P. gingivalis* ou suas moléculas em patas traseiras de camundongos BALB/c e C57BL/6. Embora as periodontites possuam certos aspectos em comum com outras doenças infecciosas, existem diversas características dessas doenças periodontais que são bastante peculiares. Diferentemente da superfície externa da maior parte do corpo, as camadas externas do dente não descamam, facilitando, assim, o acúmulo bacteriano. Além disso, a estrutura dentária possui uma característica anatômica incomum por passar através dos tecidos de modo que uma parte desta é exposta ao ambiente externo enquanto outra se encontra no interior do tecido conjuntivo

(SOCRANSKY, *et al.* 3^a. ed. 1999). Dessa forma, pode-se dizer que a doença periodontal é considerada uma das infecções humanas mais peculiares.

Evidências têm se acumulado quanto à relação da periodontite com doenças sistêmicas. Diversos estudos têm correlacionado a periodontite crônica com o risco aumentado de doenças cardiovasculares (MATILLA, 1993; BECK, 1996; ARBES, 1999; HASHIMOTO *et al.* 2006), partos prematuros e bebês de baixo peso (OFFENBACHER *et al.* 1996, 1998; DASANAYAKE, 1998; DAVENPORT *et al.*, 1998; HILL, 1998), diabetes *mellitus* (KHADER *et al.*, 2006; LIM *et al.*, 2007; NASSAR, *et al.*, 2007; NISHIMURA *et al.*, 2007) e doença renal crônica (OSHRAIN *et al.*, 1979; MARAKOGLU *et al.*, 2003; KSHIRSAGAR *et al.*, 2005). Já foi até mesmo verificada a presença de *P. gingivalis* em placas ateromatosas na carótida (HARASZTHY *et al.*, 2000). Este fato é comprovado por estudos que mostram *P. gingivalis* como um patógeno com grande capacidade de invadir a corrente sanguínea após cruzar a mucosa oral (BECK *et al.*, 2000). Especula-se que o cininogênio, liberado após infecção por *P. gingivalis*, possa funcionar como gatilho para a septicemia dessa bactéria, uma vez que ele é capaz de aumentar a permeabilidade vascular, via produção de BK, permitindo, assim, a disseminação bacteriana para outras áreas do organismo (HU *et al.*, 2006). O envolvimento da gingipaína na formação de ateromas através da indução na formação de colesterol foi alvo de investigação recente (HASHIMOTO *et al.*, 2006). Utilizando-se camundongos como modelo experimental de inoculação intravenosa de *P. gingivalis* geneticamente modificadas, foi mostrado que há o envolvimento direto das duas gingipaínas (Rgp e Kgp) com a lesão ateromatosa no coração dos animais (HASHIMOTO *et al.*, 2006).

Diversos tipos de tratamentos têm sido propostos para a periodontite e, quanto mais os mecanismos envolvidos na doença tornam-se conhecidos, mais opções de

terapia são sugeridas. O uso do antagonista de B₂R, por exemplo, como candidato a medicamento para tratamento da periodontite crônica tem sido proposto (RUBINSTEIN *et al.*, 2001). De fato, o presente estudo comprova que a presença de HOE-140, antagonista específico de B₂R, inibe a formação do edema e o desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa induzida por *P. gingivalis* ou suas moléculas purificadas. Além disso, diante da descoberta do papel desempenhado pela gingipaína na patogênese da periodontite, a imunização de animais com essa enzima tem sido explorada para vacinação e tratamento da periodontite crônica (TRAVIS *et al.*, 1997). Outras possibilidades de vacinação contra a periodontite crônica seriam a imunização com a porção N-terminal do domínio catalítico da gingipaína (Rgp) ou a imunização subcutânea com a RgpB íntegra (GENCO *et al.*, 1999; GIBSON *et al.*, 2001). Especula-se, ainda, sobre a eficácia de RgpA e Kgp, quando utilizados como imunógenos na prevenção da perda óssea provocada pela periodontite (RAJAPAKSE *et al.*, 2002). Verificou-se que animais imunizados com *P. gingivalis* mortas, apresentaram altos níveis séricos de IgG2a anti-RgpA ou Kgp, imunoglobulina característica do perfil T_H1. Dessa forma, gingipaínas são consideradas candidatas em potencial para o desenvolvimento de vacinas contra a doença periodontal. Entretanto, uma identificação funcional mais detalhada desta cisteíno-protease, bem como testes com recombinantes da bactéria devem ser o maior passo para o desenvolvimento destas vacinas.

Em resumo, os resultados desse trabalho, ilustrados na **figura 8**, sugerem que a inflamação tecidual após infecção por *P. gingivalis* se iniciaria quando o padrão molecular associado ao patógeno (PAMP)–LPS ativasse receptores do tipo TLR2 expressados por macrófagos, mastócitos ou células residentes do tecido infectado. Em seguida, haveria secreção de quimiocinas inflamatórias (eg. MIP-2) ou citocinas (eg. TNF- α). Uma vez liberadas, as cininas amplificariam a inflamação ao

estimularem células endoteliais via receptores B₂R, promovendo um maior extravasamento de plasma e cininogênio (*feedback* positivo). Células dendríticas imaturas que também expressariam receptores B₂R (ALIBERTI *et al.*, 2003) ao se ligarem à BK, iniciariam o processo de maturação e estimulariam a diferenciação de células T CD4⁺ virgens para o eixo T_H1 através de uma via dependente de IL-12 p70 (**figura 8**) (MONTEIRO *et al.*, 2006).

Para reproduzir com maior fidelidade os processos imunológicos envolvendo *P. gingivalis* e suas moléculas na cavidade oral, seria ideal a realização de estudos em modelo animal de inoculação da bactéria e suas moléculas em tecido gengival.

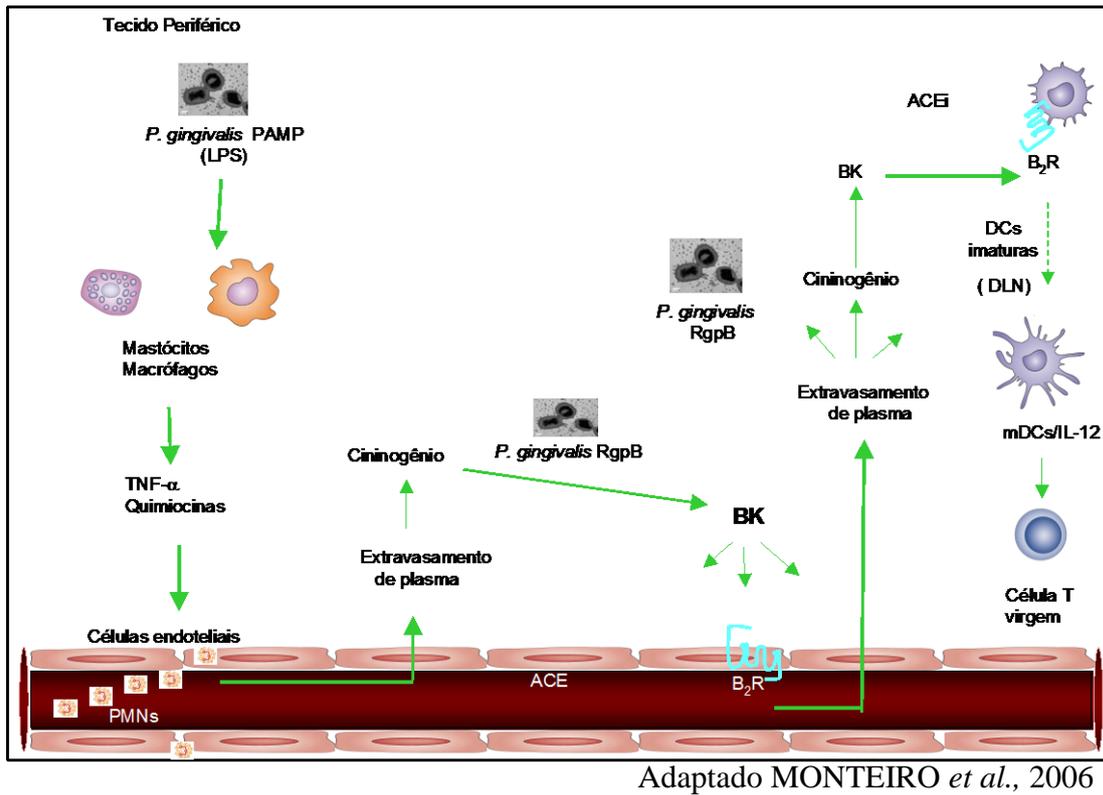


Figura 8: *P. gingivalis*, através de suas moléculas LPS e gingipaína, podem ser capazes de promover a integração entre inflamação e imunidade adaptativa através dos receptores TLR2 e B₂R. A inflamação tecidual após infecção por *P. gingivalis* se inicia quando o padrão molecular associado ao patógeno (PAMP)–LPS ativa receptores do tipo TLR2 expresso por macrófagos, mastócitos ou células residentes do tecido infectado, estimulando a secreção de quimiocinas inflamatórias (eg. MIP-2) ou citocinas (eg. TNF-α), que, por sua vez, provocam o extravasamento de plasma e seus constituintes, como o cininogênio. Uma vez liberado, o cininogênio é clivado em BK pela gingipaína. Esta cinina amplificaria a inflamação ao estimular células endoteliais via receptores B₂R, promovendo um maior extravasamento de plasma e cininogênio (*feedback* positivo). É possível que células dendríticas imaturas, que também expressariam receptores B₂R (ALIBERTI *et al.*, 2003), ao se ligarem à BK, iniciariam o processo de maturação e estimulariam a diferenciação de células T CD4⁺ virgens para o eixo T_H1 através de uma via dependente de IL-12 p70 (MONTEIRO *et al.*, 2006).

6 CONCLUSÕES

- Gingipaína e LPS de *P. gingivalis* agem cooperativamente na formação do edema através da ativação da cascata das cininas
- A participação do receptor inato TLR2 é essencial para a ativação do sistema das cininas e, desta forma, da resposta inflamatória edematogênica induzida pelo LPS (PAMP) de *P. gingivalis*
- A presença do receptor de bradicinina B₂R é crítica para o desenvolvimento da resposta imunológica
- Verificou-se predomínio do perfil de resposta imunológica adaptativa Tipo 1 em animais infectados pela bactéria e suas moléculas
- Cininas endógenas, estimuladas pela associação gingipaína/LPS, podem ser capazes de promover a integração entre inflamação e resposta imunológica adaptativa

7 REFERÊNCIAS

- ABE, N.; KADOWAKI, T.; OKAMOTO, K.; NAKAYAMA, K.; OHISHI, M.; YAMAMOTO, K. Biochemical and functional properties of Lysine-specific cysteine proteinase (Lys-Gingipain) as a virulence factor of *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. **J. Biochem.**, v. 123, n. 2, p. 305-12, 1998.
- AIDA, Y.; KUSUMOTO, K.; NAKATOMI, K.; TAKADA, H.; PABST, M.J.; MAIDA, 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.**, v. 58, p. 675-82, 1995.
- ALIBERTI, J.; VIOLA, J.P.; VIEIRA-DE-ABREU, A., BOZZA, P.T.; SHER, A.; SCHARFSTEIN, J. Cutting edge: bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells: a danger signal that drives Th1 polarization. **J. Immunol.**, v.170, p.5349-5353, 2003.
- ARBES, S.J.; SLADE, G.D.; BECK, J.D. Association between extent of periodontal attachment loss and self-reported history of heart attack: an analysis of NHANES III data. **J. Dent. Res.**, v. 78, n. 12, p. 1777-82, dec. 1999.
- BAKER, P.J.; EVANS, R.T.; ROOPENIAN, D.C. Oral Infection with *Porphyromonas gingivalis* and Induced Alveolar Bone Loss in Immunocompetent and Severe Combined Immunodeficient Mice. **Archs. Oral Biol.**, v.39, n.12, p.1035-40, 1994.
- BASU, S.; SRIVASTAVA, P. Immunological role of neuronal receptor vanilloid receptor 1 expressed on dendritic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 102, p.5120-5125, 2005.
- BECK, J.; GARCIA, R.; HEISS, G.; VOKONAS, P.S.; OFFENBACHER, S. Periodontal disease and cardiovascular disease. **J. Periodontol.** v.67, n. 10 p. 1123-36, 1996.

- BECK, J. D.; SLADE, G.; OFFENBACHER, S. Oral disease, cardiovascular disease and systemic inflammation. **Periodontol.** 2000, v.23, p. 110-20, jun. 2000.
- BHOOLA, K.D.; FIGUEROA, C.D., e WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacol Rev.**, v.44, p.1-80, 1992.
- BLAUKAT, A. Structure and signalling pathways of kinin receptors. **Andrologia**, v.35, p.17-23, 2003.
- BLAUKAT, A.; MICKE, P.; KALATSKAYA, I.; FAUSSNER, A.; MULLER-ESTERL, W. Downregulation of bradykinin B2 receptor in human fibroblasts during prolonged agonist exposure. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 284, p.1909-1916, 2003.
- BOOTH, V.; SOLAKOGLU, Ö.; BAVISHA, N.; CURTIS, M.A. Serum IgG1 and IgG2 Antibody Responses to *Porphyromonas gingivalis* in Patients With Periodontitis. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.21, n.2, p.93-103, apr. 2006.
- CAMPBELL, D.J. The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v.35, p.784-791, 2003.
- CARLSSON, J.; HERMANN, B. F.; HÖFLING, J. F.; SUNDQVIST, G.K. Degradation of the human proteinase inhibitors alpha-1-antitrypsin and alpha-2-macroglobulin by *Bacteroides gingivalis*. **Infect. Immun.**, v. 43, n. 2, p. 644-48, 1984.
- CARLSSON, J.; HÖFLING, J. F.; SUNDQVIST, G.K. Degradation of albumin, haemopexin, haptoglobin and transferrin by black-pigmented *Bacteroides* species. **J. Med. Microbiol.**, v.18, n.1, p. 39-46, 1984.
- CHEN, P.B; DAVERN, L.B; AGUIRRE, A. Experimental *Porphyromonas gingivalis* infection in nonimmune athymic BALB/c mice. **Infect. Immun.**, v.59, p. 4706-09, 1991.

- CHEN, Z.J.; POTEPA, J.; POLANOWSKI, A.; WIKSTROM, M., TRAVIS, J.
Purification and characterization of a 50-Kda cysteine proteinase (gingipain) from *Porphyromonas gingivalis*. **J. Biol. Chem.** v.267, p. 18896-18901, 1992.
- CHOU, H.H.; YUMOTO, H.; DAVEY, M.; TAKAH, Y.; MIYAMOTO, T.; GIBSON, F.C.; GENCO, C.A. *Porphyromonas gingivalis* Fimbria-Dependent Activation of Inflammatory Genes in Human Aortic Endothelial Cells. **Infect. Immun.**, v.73, n.9, p.5367-78, sep. 2005.
- DASANAYAKE, A.P. Poor periodontal health of the pregnant woman as a risk for low birth weight. **J. Periodontol.**, v.3, n.1, p. 206-12, 1998.
- DAVENPORT, E.S.; WILLIAMS, C.E.C.S.; STERNE, J.A.C., SIVAPATHASUNDRAM, V., FEARNE, J.M., CURTIS, M.A. The East London study of maternal chronic periodontal disease and preterm low birth weight infants: study design and prevalence data. **J. Periodontol.**, v.3, n.1, p. 213-21, 1998.
- DeCARLO, A.A.; PARAMAESVARAN, M.; YUN, P.L.W.; COLLYER, C.; HUNTER, N. Porphyrin-mediated binding to hemoglobin by the HA2 domain of cysteine proteinases (Gingipains) and hemagglutinins from the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 34, p. 21648-57, 1999.
- DEL NERY, E.; JULIANO, M.A.; LIMA, A.P.; SCHARFSTEIN, J.; JULIANO, L. Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**,v. 272, p.25713-25718, 1997.
- DESLAURIERS, M.; HAQUE, S.; FLOOD, P.M. Identification of Murine Protective Epitopes on the *Porphyromonas gingivalis* Fimbrillin Molecule. **Infect. Immun.**, v.64, n.2, p.434-40, feb.1996.
- DRAGOVIC, T.; SCHRAUFNAGEL, D.E.; BECKER, R.P.; SEKOSAN, M.; VOTTA-VELIS,E.G.; ERDOS, E.G. Carboxypeptidase M activity is increased in bronchoalveolar lavage in human lung disease. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.152, p.760-764, 1995.

- ELEY, B. M.; 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.**, v. 7, n. 67, p. 703-16, jul. 1996.
- ENDO, Y.; SHIBAZAKI, M.; NAKAMURA, M.; TAKADA, H. Contrasting effects of lipopolysaccharides (endotoxins) from oral black-pigmented bacteria on serotonin, and on histamine-forming enzyme in mice. **J. Infect. Dis.**, v. 175, p. 1404-12, jun. 1997.
- FARMER, S.G.; BURCH, R.M. Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 32, p. 511-536, 1992.
- GALLAGHER, P.E., LI, J.R., LENHART, M.C., CHAPPELL, AND K.B. BROSNIHAN. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. **Hypertension**, v. 33 p. 323-8, 1999.
- GEMMELL, E.; SEYMOUR, G.J. Immunoregulatory Control of Th1/Th2 Cytokine Profiles in Periodontal Disease. **Periodontol.** 2000, v. 35, p. 21-41, 2004.
- GENCO, C.A.; POTEPA, J.; MIKOLAJCZYK-PAWLINSKA, J.; TRAVIS, J. Role of gingipains R in the pathogenesis of *Porphyromonas gingivalis* – mediated periodontal disease. **Clin. Infect. Dis.**, v. 28, p. 456-65, mar. 1999.
- GIBSON III, F.C.; GENCO, C.A. Prevention of *Porphyromonas gingivalis*-induced oral bone loss following immunization with gingipain R1. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 12, p. 7959-63, dec. 2001.
- GIBSON III, F.C.; GONZALEZ, D.A.; WONG, J.; GENCO, C.A. *Porphyromonas gingivalis*- Specific Immunoglobulin G Prevents *P. Gingivalis*-Elicited Oral Bone Loss in a Murine Model. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 4, p. 2408-11, apr. 2004.

- GRAVES, D.T.; NAGIUB, G.; LU, H.; DESTA, T.; 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.**, v.11, n.1, p.13-18, 2005.
- HAIJSHENGALLIS, G.; MARTIN, M.; SCHIFFERLE, R.E.; GENCO, R.J. Counteracting Interaction between Lipopolysaccharide Molecules with Differential Activation of Toll-Like Receptors. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 12, p. 6658-64, dec. 2002.
- HARASZTHY, V. I.; ZAMBON, M.; TREVISAN, M.; ZEID, M.; GENCO, R. J. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. **J. Periodontol.**, v. 71, p. 1554-60, 2000.
- HASHIMOTO, M.; KADOWAKI, T.; TSUKUBA, T.; YAMAMOTO, K. Selective proteolysis of apolipoprotein B-100 by Arg-Gingipain mediates atherosclerosis progression accelerated by bacterial exposure. **J. Biochem.**, v. 140, p. 713-23, 2006.
- HERWALD, H.; COLLIN, M.; MULLER-ESTERL, W.; BJORCK, L. Streptococcal cysteine proteinase releases kinins: a virulence mechanism. **J. Exp. Med.**, v.184, p.665-673, 1996.
- HILL, G.B. Preterm birth: associations with genital and possibly oral microflora. **J. Periodontol.**, v. 3, n.1, p. 222-32, 1998.
- HIRSCHFELD,M.; WEIS,J.J.; TOSHCHAKOV,V.; SALKOWSKI,C.A.; CODY, M.J.; WARD, D.C.; QURESHI, N.; MICHALEK, S.M.; VOGEL, S.N. Signaling by Toll-Like Receptor 2 and 4 Agonists Results in Differential Gene Expression in Murine Macrophages. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 3, p. 1477-82, mar. 2001.
- HOLT, S.C; BRAMANTI, T.E. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. **Crit. Rve. Oral Biol. Chem.**, v.380, p. 75-80, 1991.

- HOLT, S.C & EBERSOLE, J.L. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the “red complex”, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. **Periodontol.** **2000**, v. 38, p. 72-122, 2005.
- HU, S.W.; HUANG, C.H.; HUANG, H.C.; LAI, Y.Y. Transvascular Dissemination of *Porphyromonas gingivalis* from a Sequestered Site is Dependent upon Activation of the Kallikrein/kinin Pathway. **J. Periodontol. Res.**, v. 41, n. 3, p. 200-07, 2006.
- IMAMURA, T.; BAMBULA, A.; PEREIRA, P.J.B.; TRAVIS, J.; POTEPA, J. Activation of human prothrombin by Arginine-specific Cysteine proteinases (Gingipain-R) from *Porphyromonas gingivalis*. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n.22, p.18984-91, 2001.
- IMAMURA, T.; PIKE, R. N.; POTEPA, J.; TRAVIS, J. Pathogenesis of periodontitis: a major arginine-specific cysteine proteinase from *P.g.* induces vascular permeability enhancement through activation of the kalikrein/kinin pathway. **J. Clin. Invest.**, v.94, p.361-67, jul. 1994.
- IMAMURA, T.; POTEPA, J; PIKE, R. N.; MOORE, J.N.; BARTON, M.H.; TRAVIS, J. Effect of free and vesicle-bound cysteine proteinases of *Porphyromonas gingivalis* on plasma clot formation: implications for bleeding tendency at periodontitis sites. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 63, p. 4877- 82, dec. 1995.
- IMAMURA, T.; POTEPA, J; PIKE, R. N.; TRAVIS, J. Dependence of vascular permeability enhancement on cysteine proteinases in vesicles of *Porphyromonas gingivalis*. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 5, p. 1999-2003, may. 1995.
- IMAMURA, T.; POTEPA, J; TANASE, S.; TRAVIS, J. Activation of blood coagulation Factor X by Arginine-specific Cysteine proteinases (Gingipain-Rs) from *Porphyromonas gingivalis*. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 25, p. 16062-71, jun 20.1997.
- IMAMURA, T.; POTEPA, J.; TRAVIS J. Activation of the kallikrein-kinin system and release of new kinins through alternative cleavage of kininogens by microbial and human cell proteinases. **Biol. Chem.**, v.385, p.989-996, 2004.

- IMAMURA, T.; TANASE, S.; HAMAMOTO, T.; POTEMPA, J.; TRAVIS, J. Activation of blood coagulation Factor IX by gingipains R, arginine-specific cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. **Biochem. J.**, v.353 Pt2, p. 352-31, 2001 jan. 2001.
- IMAMURA, T.; TANASE, S.; SZMYD, G.; KOZIK, A.; TRAVIS, J.; POTEMPA, J. Induction of vascular leakage through release of bradykinin and a novel kinin by cysteine proteinases from *Staphylococcus aureus*. **J. Exp. Med.**, v.201, p.1669-1676, 2005.
- INAGAKI, S.; ISHIHARA, K.; YASAKI, Y.; YAMADA, S.; OKUDA, K. Antibody Responses of Periodontitis Patients to Gingipains of *Porphyromonas gingivalis*. **J. Periodontol.**, v.74, n.10, p.1432-39, oct. 2003.
- ISOGAI, H.; TAKAGI, S.; ISHII, N.; FUJII, N.; KIMURA, K.; HAYASHI, M.; TOSHIMURA, F. Fimbria-specific immune response in various inbred mice inoculated with *Porphyromonas gingivalis* 381. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.9, n.2, p.118-22, apr. 1994.
- IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat. Immunol.**, v.5, p.987-995, 2004.
- JOTWANI, R.; CUTLER, C. W. Fimbriated *Porphyromonas gingivalis* is more efficient than fimbria-deficient *Porphyromonas gingivalis* in entering human dendritic cells in vitro and induces an inflammatory T_H1 effector response. **Infect. Immun.**, v.72, n.3, p.1725-32, mar. 2004.
- KADOWAKY, T.; NAKAYAMA, K.; OKAMOTO, K.; ABE, N.; BABA, A.; SHI, Y.; RATNAYAKE, D. B.; YAMAMOTO, K. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence determinants in progression of periodontal disease. **J. Biochem. (Tokyo)**, v. 2, n. 128, p. 153-9, aug. 2000.

KAMINISHI, H.; CHO, T.; ITOH, T.; IWATA, A.; KAWASAKI, K.; HAGIHARA, Y.; MAEDA, H. Vascular permeability enhancing activity of *Porphyromonas gingivalis* proteinase in guinea pigs. **FEMS Microbiol. Let.**, v.114, n. 1, p.109-14, nov. 1993.

KHADER, Y.S.; DAUOD, A.S.; EL-QADERI, S.S.; ALKAFAJEI, A.; BATAYHA, W.Q. Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: a meta-analysis. **J. Diabetes Complications**, v.20, n. 1, p.59-68, jan-feb. 2006.

KISHIMOTO, M.; YOSHIMURA, A.; NAITO, M.; OKAMOTO, K.; YAMAMOTO, K.; GOLENBOCK, D.T.; HARA, Y.; NAKAYAMA, K. Gingipains Inactivate a Cell Surface Ligand on *Porphyromonas gingivalis* that induces TLR2 and TLR4-Indedente Signaling. **Microbiol. Immunol.**, v.50, n.4, p.315-25, 2006.

KOZIK, A.; MOORE, R.B.; POTEPA, J.; IMAMURA, T.; RAPALA-KOZIK, M.; TRAVIS, J. A novel mechanism for bradykinin production at inflammatory sites. Diverse effects of a mixture of neutrophil elastase and mast cell tryptase versus tissue and plasma kallikreins on native and oxidized kininogens. **J. Biol. Chem.**, v.273, p.33224-33229, 1998

KSHIRSAGAR, A.V.; MOSS, K. L.; ELTER, J. R.; BECK, J. D.; OFFENBACHER, S.; FALK, R.J. Periodontal Disease is associated with renal insufficiency in the atherosclerosis risk in communities (ARIC). **American Journal of Kidney Diseases**, v.45, n.4, p.650-57,.2005.

LEONE, C.W.; BOKHADHOOR, H.; KUO, D.; DESTA, T.; YANG, J.; SIQUEIRA, M.F.; AMAR, S.; GRAVES, D.T. Immunization hances Inflammation and Tissue Destruction in Response to *Porphyromonas gingivalis*. **Infect. Immun.**,v.74, n.4, p.2286-92, apr. 2006.

LIM, L.P.; TAY, F.B.; SUM, C.F.; THAI, A.C. Relationship between markers of metabolic control and inflammation on severity of periodontal disease in patients with diabetes mellitus. **J. Clin. Periodontol.**, v.34, n.2, p.118-23, feb. 2007.

LIMA, A.P.; ALMEIDA, P.C.; TERSARIOL, I.L.; SCHMITZ, V.; SCHMAIER, A.H.; JULIANO, L.; HIRATA, I.Y.; MULLER-ESTERL, W.; CHAGAS, J.R.;

- SCHARFSTEIN, J. Heparan sulfate modulates kinin release by *Trypanosoma cruzi* through the activity of cruzipain. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p.5875-5881, 2002.
- LOURBAKOS, A.; YUAN, Y.; JENKINS, A.L.; TRAVIS, J.; ANDRADE-GORDON, P.; SANTULLI, R.; POTEPA, J.; PIKE, R.N. Activation of protease-activated receptors by gingipains from *Porphyromonas gingivalis* leads to platelet aggregation: a new trait in microbial pathogenicity. **Blood**, v. 97, n. 12, p. 3790-97, jun 15.2001.
- MANSHEIM, B.J.; ONDERDON, K.A.B.; KASPER, D.L. Immunochemical and biologic studies of the lipopolysaccharide of *Bacteroides melaninogenicus* subspecies *asaccharolyticus*. **J. Immunol.**, v. 120, p. 72-78, 1978.
- MARAKOGLU, I.; GURSOY, U.K.; DEMIRER, S.; SEZER, H. Periodontal status of chronic renal failure patients receiving hemodialysis. **Yonsei Medical Journal**, v. 44, n. 4, p. 648-52, aug 2003.
- MARCEAU, F., and BACHVAROV, D. R.. Kinin receptors. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 16, p.385-401, 1998.
- MATILLA, K.J.; VALLE, M.S.; NIEMINEN, M.S.; VALTONEN, V.V.; HIETANIEMI, K.L. Dental infectious and coronary atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 103, p. 205-11, 1993.
- MATZINGER, P. The danger model: a renewed sense of self. **Science**, v. 296, p.301-305, 2002.
- McGRAW, W.T.; POTEPA, J.; FARLEY, D.; TRAVIS, J. Purification, Characterization, and Sequence Analysis of a Potential Virulence Factor from *Porphyromonas gingivalis*, Peptidylarginine Deiminase. **Infect. Immun.**, v.67, n.7, p. 3248-56, jul. 1999.
- MONTEIRO, A.C; SCHMITZ, V.; SVENSJO, E.; GAZZINELLI, R.T.; 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.; MÜLLER-

- ESTERL, W.; 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.**, v. 177, n. 9, p. 6325-35, nov. 2006.
- NASSAR, H.; KANTARCI, A.; VAN-DYKE, T.E. Diabetic periodontitis: a model for activated innate immunity and impaired resolution of inflammation. **Periodontol** **2000**, v.43, p. 233-44, 2007.
- NISHIMURA, F.; IWAMOTO, Y.; SOGA, Y. The periodontal host response with diabetes. **Periodontol** **2000**, v.43, p. 245-53, 2007.
- O'BRIEN-SIMPSON, N.M.; PAOLINI, R.A.; HOFFMANN, B.; SLAKESKI, N.; DASHPER, S.G.; REYNOLDS, E.C. Role of RgpA, RgpB, and Kgp proteinases in virulence of *Porphyromonas gingivalis* W50 in a murine lesion model. **Infect. Immun.**, v.69, n. 12, p. 7527-34, dec. 2001.
- ODELL, E. W.; WU, P. J. Susceptibility of *P. gingivalis* and *P. asaccharolytica* to the non-oxidative killing mechanisms of human neutrophils. **Archs. Oral Biol.**, v. 37, n. 8, p. 597-601, 1992.
- OFFENBACHER, S.; JARED, H.L.; O'REILLY P.G.; WELLS, S.R.; SALVI, G.E.; LAWRENCE, H.P.; SOCRANSKY, S.S.; BECK, J.D. Potential pathogenic mechanisms of periodontitis-associated pregnancy complications. **J. Periodontol.**, v.3, n.1, p. 233-50, 1998.
- OFFENBACHER, S.; KATZ, V.; FERTIK, G.; COLLINS, J.; BOYD, D.; MAYNOR, G.; McKAIG, R.; BECK, J. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. **J. Periodontol.**, v.67, n.10, p. 1103-13, oct.1996.
- OIDO-MORI, M.; REZZONICO, R.; WANG, P.L.; KOWASHI, Y.; DAYER, J.M.; BAEHNI, P.C.; CHIZZOLINI, C. *Porphyromonas gingivalis* Gingipain-R Enhances Interleukin-8 but Decreases Gamma Interferon-Inducible Protein 10 Production by Human Gingival Fibroblasts in Response to T-Cell Contact. **Infect. Immun.**, v.69, n.7, p.4493-4501, jul. 2001.

- OKAHASHI, N.; INABA, H.; NAKAGAWA, I.; YAMAMURA, T.; KUBONIWA, M.; NAKAYAMA, K.; HAMADA, S.; AMANO, A. *Porphyromonas gingivalis* Induces Receptor Activator of NFκB Expression in Osteoblasts Through the Activator Protein 1 Pathy. **Infect. Immun.**, v.72, n.3, p.1706-14, mar. 2004.
- OSHRAIN, H. I.; MENDER, S.; MANDEL, I. D.; Periodontal Status of patients with reduced immunocapacity. **Journal of Periodontology**, v.50, n.4, p.185-88, 1979.
- PIKE, R.; MCGRAW, W.; POTEMPA, J.; TARVIS, J. Lysine and arginine-specific proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. Isolation, characterization and evidence for the existence of complexes with hemagglutinins. **J. Biol. Chem.** v.269, p.406-11, 1994.
- PINHEIRO, M.L.B.; FERES FILHO, E.J.; GRAVES, D.T.; TAKIYA,C.; ELSAS, M.I.G.; ELSAS, P.P.; LUZ, R.A. Quantification and localization of platelet-derived growth factor in gingiva of periodontitis patients. **J. Periodontol.**, v. 74, n. 3, p. 323-28, mar. 2003.
- POTEMPA, J.; BANDULA, A.; TARVIS, J. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. **Periodontol. 2000**, v.24, p.153-92, 2000.
- POTEMPA, J.; MIKOLAJCZYK-PAWLINSKA, J.; BRASSELL, D.; NELSON, D.; THOGERSEN, I.D.; ENGHILD, J.J.; TRAVIS, J. Comparative Properties of Two Cysteine Proteinases (Gingipains R), the Products of Two Related but Individual Genes of *Porphyromonas gingivalis*. **J. Biol. Chem.**, v.273, n.34, p.21648-57, aug. 1998.
- POTEMPA, J.; PIKE, R.; TRAVIS, J. The Multiple forms of Trypsin-like activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of

either Arg-Gingipain or Lys-Gingipain. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 4, p. 1176-82, apr. 1995.

RAJAPAKSE, P.S.; O'BRIEN-SIMPSON, N.M.; SLAKESKI, N.; HOFFMANN, B.; REYNOLDS, E. Immunization with the RgpA-Kgp Proteinase-Adhesin Complexes of *Porphyromonas gingivalis* Protects Against Periodontal Bone Loss in the Rat Periodontitis Model. **Infect. Immun.**, v.70, n.5, p. 2480-86, may. 2002.

ROBERTS, F.A.; RICHARDSON, G.J.; MICHAELE, K.S.M. Effects of *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* lipopolysaccharides on mononuclear phagocytes. **Infect. Immun.** v.65, p. 3248-3254, 1997.

RUBINSTEIN, I.; POTEMPA, J.; TRAVIS, J.; GAO, XP. Mechanisms mediating *Porphyromonas gingivalis* gingipain RgpA-induced oral mucosa inflammation *in vivo*. **Infect. Immun.**, v. 69, n.2, p. 1199-1201, feb. 2001.

SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; MORANDI, V.; CAPELLA, M.M.; LIMA, A.P.; MORROT, A.; JULIANO, L.; MULLER-ESTERL, W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. **J. Exp. Med.**, v.192, p.1289-1300, 2000.

SCHENKEIN, H. A. The effect of periodontal proteolytic *Bacteriodes* species on proteins of the human complement system. **J. Periodont. Res.**, v. 23, n. 2, p.187-92, 1988.

SCHMAIER, A.H. The physiologic basis of assembly and activation of the plasma kallikrein/kinin system. **Thromb. Haemost.**, v. 91, p.1-3, 2004.

SCHNURR, M.; THEN, F; GALAMBOS, P.; SCHOLZ, C.; SIEGMUND, B.; ENDRES, S.; EIGLER, A. Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. **J. Immunol.**, v.165, p.4704-4709, 2000.

- SHAH, H.N.; MAYRAND, D.; GENCO, R. Biology of the species *Porphyromonas gingivalis*. CRC Press, Boca Raton, Fla, 1993.
- SHAW, J.H. Causes and control of dental caries. **N. Eng. J. Med.**, v.317, n.16 p.996-1004, oct.1987.
- SHI, Y.; . EVANS, J.E.; ROCK K.L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. **Nature** v.425, p.516-521, 2003.
- SHIGEMATSU, S., ISHIDA, S.; GUTE, D.C.; KORTHUIS, R.J. Concentration-dependent effects of bradykinin on leukocyte recruitment and venular hemodynamics in rat mesentery. **Am. J. Physiol.**, v.277, p.152-160, 1999.
- SHIGEMATSU, S., ISHIDA, S.; GUTE, D.C.; KORTHUIS, R.J. Postischemic anti-inflammatory effects of bradykinin preconditioning. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 280, p.441-454, 2001.
- SHIGEMATSU, S., ISHIDA, S.; GUTE, D.C.; KORTHUIS, R.J. Bradykinin-induced proinflammatory signaling mechanisms. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 283, p.2676-2686, 2002.
- SKIDGEL, R.A.; ERDOS, E.G. Angiotensin converting enzyme (ACE) and neprilysin hydrolyze neuropeptides: a brief history, the beginning and follow-ups to early studies. **Peptides**, v. 25, p.521-525, 2004.
- SOCRANSKY, S.S; HAFFAJEE, A.D. Microbiologia da Doença Periodontal. In. Lindhe, J. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 3. ed. Guanabara Koogan, 1999, cap.4, p. 92-93.
- SPORRI, R.; REIS E SOUSA, C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. **Nat. Immunol.**, v.6, p.163-170, 2005.
- SRIVASTAVA, P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. **Nat Rev. Immunol.**, v. 2, p.185-194, 2002.

- SUGAWARA, S.; NEMOTO, E.; TADA, H.; MIYAKE, K.; IMAMURA, T.; TAKADA, H. Proteolysis of human monocyte CD14 by cysteine proteinases (gingipains) from *Porphyromonas gingivalis* leading to lipopolysaccharide hyporesponsiveness. **J. Immunol.**, v.1, n.165, p.411-18, jul. 2000.
- SUNDQVIST, G.; CARLSSON, J.; HERRMANN, B.; TÄRNVI, K. A. Degradation of human immunoglobulins G and M and complement factor C3 and C5 by black-pigmented *Bacteriodes*. **J. Med. Microbiol.**, v. 19, n.1, p. 85-94, feb. 1985.
- SVENSKÖ, E.; BATISTA, P.R.; SILVA, R.; . BRODSKYN, C.I.; SCHMITZ, V.; SARAIVA, E.; LIMA, A.P.C.A., PESQUERO, J.B.; MORI, M.A.S.; MULLER-ESTERL, W.; SCHARFSTEIN, J. *in press*. Interplay Between Parasite Cysteine Proteases And the Host Kinin System Modulates Microvascular Leakage And Macrophage Infection by Promastigotes of the *Leishmania donovani* complex. **Microbes and Infect.** v.8, n. 1, p. 206-20, jan. 2006.
- TABETA, K.; YAMAZAKI, K.; AKASHI, S.; MIYAKE, K.; KUMADA, H.; UMEMOTO, T.; YOSHIE, H. Toll-Like Receptors Confer Responsiveness to Lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in Human Gingival Fibroblasts. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 6, p. 3731-35, jun. 2000.
- TAKEUCHI, Y.; ARAMAKI, N.; NAGASAWA, T.; UMEDA, M.; ODA, S.; ISHIKAWA, I. Immunoglobulin G subclass antibody profiles in *Porphyromonas gingivalis*-associated aggressive and chronic periodontitis patients. **Oral Microbiol. Immunol.** , v. 21, n. 5, p. 314-18, 2006.
- TODOROV, A.G.; ANDRADE, D.; PESQUERO, J.B.; ARAUJO, R.C.; BADER, M.; STEWART, J.; GERA, L.; MÜLLER-ESTERL, W.; MORANDI, V.; GOLDENBERG, R.C.S.; CASTRO-FARIA NETO, H.; SCHARFSTEIN, J. *Trypanosoma cruzi* induces edematogenic responses in mice and invades cardiomyocytes and endothelial cells in vitro by activating distinct kinin receptor (B1/B2) subtypes. **FASEB J.**, v.17, n.1, p. 73-5, jan. 2003.

TRAVIS, J.; PIKE, R.; IMAMURA, T.; POTEMPA, J. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. **J. Periodont. Res.**, v. 32, n. 1 pt2, p.120-25, 1997.

WILLIAMS, R.C. Periodontal Disease. **New Engl. J. Med.**, v.322, n.6, p.373-82, feb. 1990.

YASAKI-INAGAKI, Y.; INAGAKI, S.; YAMADA, S.; OKUDA, K.; ISHIHARA, K. Production of protective antibodies against *Porphyromonas gingivalis* by immunization with recombinant gingipain domains. **FEMS**, v.47, n. 2, p. 287-95, 2006.

YOSHIMURA, A.; KANEKO, T.; KATO, Y.; GOLENBOCK, D.T.; HARA, Y. Lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* are Antagonists for Human Toll-Like Receptor 4. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 1, p. 218-25, jan. 2002.

8 ERRATA

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](#)