



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KATIA KEY OSHIRO

**INFECÇÃO BUCAL E RESPOSTA IMUNE
HUMORAL A LEUCOTOXINA DE *Aggregatibacter*
actinomycetemcomitans EM CAMUNDONGO**

Londrina
2008

KATIA KEY OSHIRO

**INFECÇÃO BUCAL E RESPOSTA IMUNE
HUMORAL A LEUCOTOXINA DE *Aggregatibacter*
actinomycetemcomitans EM CAMUNDONGO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito final para a obtenção do título de MESTRE em Microbiologia.

Orientadora: Dra. Eiko Nakagawa Itano

Londrina
2008

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

O82i Oshiro, Katia Key.

Infecção bucal e resposta imune humoral a leucotoxina de *aggregatibacter actinomycetemcomitans* em camundongo / Katia key Oshiro. – Londrina, 2010.
44 f. : il.

Orientador: Eiko Nakagawa Itano.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2008.

Inclui bibliografia.

1. Microbiologia – Teses. 2. Actinobacillus – Teses. 3. Periodontite – Teses. I. Itano, Eiko Nakagawa. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579.87

KATIA KEY OSHIRO

**INFECÇÃO BUCAL E RESPOSTA IMUNE
HUMORAL A LEUCOTOXINA DE *Aggregatibacter*
actinomycetemcomitans EM CAMUNDONGO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito final para a obtenção do título de MESTRE em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Mirian Marubayashi Hidalgo
UEM – Maringá - PR

Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo
UEL – Londrina - PR

Londrina, 22 de fevereiro de 2008.

Dedico este trabalho às duas pessoas mais importantes em minha vida: Marcia Naguissa

Sequii e Rafael Osti de Melo

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano pela orientação, dedicação e conhecimentos transmitidos durante o decorrer do trabalho.

À Profa. Dra. Mirian Marubayashi Hidalgo por ter aceitado tão prontamente o convite para participar da banca examinadora.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, em especial à Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo por ter aceitado o convite, mas principalmente pela amizade e carinho.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunologia Aplicada pelas experiências compartilhadas, pelo carinho e auxílio nos experimentos. Em especial à Profa. Dra. Fernanda Akemi Nakanishi pelo apoio incondicional, companheirismo e valioso auxílio na confecção desse trabalho.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Patologia e Microbiologia pela prestatividade, em especial à Mari Kaminami Sumigawa e Nilson de Jesus Carlos pelos ensinamentos, conselhos e amizade.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Obtenção da fração de leucotoxina por cromatografia de extratos sonificados de <i>A.actinomycescomitans</i> em coluna de <i>Sephadex G200</i>	40
Figura 2 – Nível de IgG anti-leucotoxina plasmática de camundongos obtido por ELISA clássico	41
Figura 3 – Nível de imuno complexo IgG-anti-leucotoxina –leucotoxina no plasma de camundongos por ELISA.....	41
Figura 4 – Nível de leucotoxina no tecido palatino de camundongos por ELISA.....	42
Figura 5 – Nível de leucotoxina em amostra de coração de camundongos por ELISA.....	43
Figura 6 – Nível de Leucotoxina no Baço de Camundongos por ELISA	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1	DOENÇA PERIODONTAL	9
2.2	<i>AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS</i>	10
2.2.1	Leucotoxina	11
2.2.2	Anticorpos Específicos.....	15
2.2.3	Modelo Experimental de Doença Peridontal em Camundongos.....	16
3	OBJETIVO	18
3.1	OBJETIVO GERAL	18
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4	REFERÊNCIAS	19
5	ARTIGO	25
5.1	TÍTULO: INFECÇÃO BUCAL E RESPOSTA IMUNE HUMORAL A LEUCOTOXINA DE <i>AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS</i> EM CAMUNDONGO	25
5.2	RESUMO.....	26
5.3	ABSTRACT.....	26
5.4	INTRODUÇÃO	27
5.5	MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.5.1	Microrganismo	28
5.5.2	Animais	28
5.5.3	Obtenção de Extrato Sonicado	28
5.5.4	Cromatografia em Coluna Sephadex g-200	29
5.5.5	Infecção de Camundongos com <i>A. actinomycetemcomitans</i>	29
5.5.6	Obtenção dos Anticorpos Policlonais Anti-leucotoxina <i>A.</i> <i>actinomycetemcomitans</i> ATCC 43718.....	29
5.5.7	Obtenção dos Anticorpos Monoclonais Anti-leucotoxina <i>A.</i> <i>actinomycetemcomitans</i> ATCC 43718.....	30

5.5.8	Análise de Reatividade dos Anticorpos Monoclonais e Policlonais Anti-leucotoxina de <i>A. actinomycetemcomitans</i> às frações de Cromatografia.....	30
5.5.9	Análise de Unidade Formadora de Colônia (cfu).....	31
5.5.10	Análise de igg Anti-leucotoxina de <i>A. actinomycetemcomitans</i> no Plasma por Elisa.....	31
5.5.11	Análise de Imuno Complexo no Plasma por Elisa.....	31
5.5.12	Elisa Captura para Detecção de Antígeno em Órgãos	32
5.5.13	Análise Estatística	32
5.6	RESULTADOS.....	32
5.6.1	Análise de Reatividade dos Anticorpos Monoclonais e Policlonais Anti-leucotoxina de <i>A. actinomycetemcomitans</i> às Frações de Cromatografia.....	32
5.6.2	Análise de Unidade Formadora de Colônia	32
5.6.3	Análise de igg Anti-leucotoxina de <i>A. actinomycetemcomitans</i> no Plasma.....	33
5.6.4	Análise de Imuno Complexo no Plasma	33
5.6.5	Análise da Infecção por Meio de Detecção de Leucotoxina em Amostras de Palato.....	33
5.6.6	Detecção de Leucotoxina em Amostras de Coração e Baço.....	33
5.7	DISCUSSÃO	33
	CONCLUSÕES.....	36
	REFERÊNCIAS	37
	ANEXO.....	39

1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral humana é habitada por mais de 500 espécies bacterianas, sendo a maioria comensal e uma pequena parte considerada periodonto patogênica, com potencial de causar doenças periodontais.

As doenças periodontais englobam um número de entidades clínicas distintas que afeta o periodonto, incluindo gengiva, gengiva inserida, ligamento periodontal, cemento e osso alveolar de suporte. Considerando a natureza inflamatória envolvida, esses quadros patológicos estão diretamente relacionados com a resposta imune ao agente etiológico e ou seus produtos, acarretando no dano ao tecido do hospedeiro.

O diagnóstico das patologias periodontais, principalmente da periodontite, é difícil e na maioria das vezes, feito tardiamente, diminuindo a eficiência do tratamento, uma vez que, a destruição do osso alveolar é naturalmente irreversível.

A presença de patógenos na cavidade oral implica inicialmente na instalação de doenças bucais, porém tudo indica que pode haver uma relação com doenças em outros locais, apontando a disseminação de microrganismos dos tecidos bucais para outros tecidos através da corrente sanguínea.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, patógeno da cavidade bucal, têm sido relacionado a endocardites, doenças arteriais periféricas, infecções urinárias entre outras. Essa associação é reforçada pelo isolamento do microrganismo nos tecidos infectados.

Dessa maneira o estudo da doença periodontal desencadeada pelo *A. actinomycetemcomitans*, bem como a sua disseminação para outros órgãos, é de extrema importância para o desenvolvimento e aplicação de diagnóstico, tratamento e monitoramento de forma adequada e eficiente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇA PERIODONTAL

A doença periodontal ou periodontite, definida como uma doença inflamatória dos tecidos de suporte dos dentes, é causada por microrganismos específicos resulta em uma destruição progressiva do ligamento periodontal e do osso alveolar de suporte (NOVAK, 2004).

O caráter destrutivo da periodontite crônica (PC) e sua progressão são mantidos na presença de placa bacteriana subgingival e pode estar associado a grupos específicos de bactérias. Dados clínicos revelam que esta patologia é a maior responsável pela perda de dentes, devido à sua natureza clínica e indolor, desenvolvendo-se de forma gradativa e assintomática. Somente nos últimos estágios, com a presença de bolsas periodontais profundas e mobilidade dental acentuada, ela é percebida (MACHION *et al.*, 2000).

A PC embora ocorra mais comumente em indivíduos adultos, pode ocorrer em qualquer idade e é a patologia periodontal mais freqüente na população. A doença é caracterizada clinicamente por perda de inserção óssea e conjuntiva, formação de bolsa periodontal e inflamação gengival. Em muitos casos, também pode ser observado o aumento ou recessão do tecido gengival, sangramento gengival à sondagem, mobilidade dental aumentada e, finalmente, inclinação e esfoliação dental (PAGE & SCHROEDER, 1976). A quantidade de destruição tecidual observada na periodontite crônica é consistente com a presença de fatores locais como presença de diferentes espécies bacterianas e cálculo subgingival (Querido *et al.*, 2006).

Em contrapartida, a forma agressiva da doença é caracterizada por uma rápida perda de inserção conjuntiva e destruição óssea, podendo ocorrer de forma localizada ou generalizada. A severidade do quadro observado na periodontite agressiva não é proporcional a quantidade de placa bacteriana, ou seja, a rápida destruição dos tecidos periodontais não condiz com o pequeno número de bactérias (CORTELLI *et al.*, 2002).

Na periodontite agressiva localizada (PAL) ocorre o comprometimento, principalmente, dos dentes incisivos e primeiros molares permanentes. É a forma de doença periodontal mais associada com *A. actinomycetemcomitans* e com disfunção de neutrófilos. Em alguns estudos com indivíduos apresentando periodontite agressiva, *A.*

actinomycetemcomitans foi isolado de bolsas periodontais em uma proporção de 75 a 100% (ZAMBON, 1996). Já a forma generalizada (PAG) apresenta episódios pronunciados de destruição periodontal, sinais mais evidentes de inflamação dos tecidos periodontais e maior quantidade de placa bacteriana e cálculo dental, quando comparada à forma localizada.

Em pacientes com doença periodontal observa-se níveis séricos elevados de mediadores inflamatórios incluindo IL-6, proteína-C-reativa, TNF- α , INF- γ e IL-1 β em comparação com indivíduos periodontalmente saudáveis (GARLET *et al.*, 2005).

2.2 AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS

A relação entre a presença de periodonto patógenos e bolsa periodontal é evidente em diversos estudos (SLOTS, 1986; SOCRANSKY *et al.*, 1990; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1994; TAKEUCHI *et al.*, 2001; TRAN *et al.*, 2001).

Em populações brasileiras, a presença de periodonto patógenos tem sido relacionada a diferentes condições clínicas. Patógenos como *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans* e *P.gingivalis* apresentam maior prevalência em indivíduos com periodontite em comparação aos periodontalmente saudáveis (KLEIN & GONÇALVEZ, 2003). Entretanto, também podem ser encontrados em indivíduos com saúde periodontal (AVILA-CAMPOS & VELASQUEZ-MELENDZ, 2002).

Zambon (1985) retratou que *A. actinomycetemcomitans* associado aos primeiros relatos de casos de actinomicose cervico-facial humana foi inicialmente denominado de *Bacterium actinomycetum comitans*, por Klinger em 1912. Mais tarde, em 1921 esse nome foi alterado para *Bacterium comitans* por Lieske; em 1929 passou a ser chamado de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* por Topley & Wilson, e mais recentemente reclassificado como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (NØRSKOV-LAURITSEN & KILIAN, 2006).

Trata-se de um cocobacilo, gram-negativo, não formador de esporos, não móvel, microaerófilo (5-10% CO₂), fermentativo e produtor de catalase (ZAMBON, 1985). Apresenta desde formas cocóides até pequenos bastonetes encurvados, podendo aparecer individualmente, em pares ou pequenos agrupamentos (HOLT *et al.*, 1980). Em isolamento primário, as colônias são translúcidas, com estrutura interna em forma de estrela e aderidas fortemente à superfície do meio sólido (SLOTS *et al.*, 1980).

O referido cocobacilo é classificado em dez biotipos conforme a utilização dos açúcares (SLOTS, REYNOLD, GENKO, 1980) e dividido em sorotipos a, b, c, d, e, f baseado nos antígenos de parede celular (ZAMBON, SLOTS, GENKO, 1983b, GMÜR *et al.* 1993; KAPLAN *et al.*; 2001).

A morfologia e/ou genótipo de *A. actinomycetemcomitans* varia entre duas formas: a aderente, com presença de fimbrias sendo característico de cepas recém isoladas *in vitro* e; a forma não-aderente; obtido após vários repiques também *in vitro*. A perda irreversível de fimbrias parece não afetar a capacidade de formação do biofilme pelo *A. actinomycetemcomitans*, no entanto, pode ser relacionado com a redução de virulência da cepa (FINE *et al.*, 1999).

A. actinomycetemcomitans foi primeiramente reconhecido como um provável patógeno periodontal por sua freqüente detecção em lesões de periodontite agressiva (CHUNG *et al.*, 1989). Trata-se de um microrganismo que pode ser transmitido entre indivíduos de uma mesma família na periodontite agressiva e em algumas formas de periodontite crônica (SLOTS & HAJAJEE, 1994).

Há uma forte correlação entre a perda de ligamento do tecido periodontal e a alta proporção de *A. actinomycetemcomitans* nos locais afetados (VAN WINKELHOFF *et al.*, 1994). Além disso, essa bactéria pode ser responsável por infecções não-buciais incluindo endocardites, pneumonia, artrite infecciosa, osteomielite, infecções do trato urinário e vários tipos de abscessos (VAN WINKELHOFF *et al.*, 2002). Também tem sido detectada em amostras de placas ateroscleróticas, sugerindo que há uma ligação entre a bactéria e doenças cardiovasculares (HARASZTHY *et al.*, 2000).

Cortelli e colaboradores (2005) observaram que *A. actinomycetemcomitans* de máxima leucotoxicidade esteve associada ao diagnóstico de periodontite agressiva e à presença de bolsas periodontais maiores do que 6 mm de profundidade em indivíduos diagnosticados com periodontites crônica e agressiva.

2.2.1 Leucotoxina

Muitas substâncias biologicamente ativas são produzidas por essa bactéria e estas, individual ou coletivamente, podem estar envolvidos na instalação e progressão da doença (SLOTS, 1994). Os fatores de virulência associados às células ou aos produtos

secretados são importantes na colonização e no crescimento no tecido hospedeiro. A interação entre o hospedeiro e os componentes bacterianos determina o desenrolar e o prognóstico de qualquer infecção

Dentre os fatores biologicamente ativos que podem atuar prejudicando a resposta do organismo hospedeiro, a leucotoxina é o melhor caracterizado, sendo considerado o principal fator de virulência com potencial para causar dano tecidual.

Leucotoxinas são um grupo de exotoxinas que produzem seus primeiros efeitos tóxicos contra leucócitos, especialmente células polimorfonucleares (PMNs). Leucotoxinas podem apresentar uma grande variedade química. Exemplos de bactérias Gram-negativas que produzem leucotoxina são *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *A. actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium necrophorum*.

A primeira descrição da atividade leucotóxica foi em 1979 por Baehni e colaboradores, na cepa FDC Y4 isolada da bolsa periodontal de paciente com periodontite agressiva e caracterizada por atuar tanto na destruição de células fagocíticas (polimorfonucleares, neutrófilos, monócitos e macrófagos humanos), como também na destruição de células apresentadoras de antígeno (monócitos e macrófagos humanos) durante resposta imune específica.

A obtenção da leucotoxina pode ser feita de diversas maneiras, tais como por incubação de *A. actinomycetemcomitans* viáveis em água destilada, a 37°C durante seis horas, ou em soro humano normal (inativado a 56°C por 30 minutos) a 37°C durante 45 minutos, resultando na liberação dessa toxina solúvel (TSAI *et al.*, 1979), ou extraída por sonicação do microrganismo (TSAI *et al.*, 1979; SUSUKI; PARK; FALKER, 1984), ou ainda por cultivo de *A. actinomycetemcomitans* com antibiótico polimixina B que atua na membrana citoplasmática (TSAI *et al.*, 1984).

A leucotoxina apresenta massa molecular entre 115 a 180 kDa (TSAI *et al.*, 1984) e pode ser inativada a 56°C por 30 minutos ou por ação de proteases (TAICHMAN *et al.*, 1980). A purificação pode ser feita por cromatografia por gel filtração e de troca iônica ou pela cromatografia de afinidade utilizando anticorpos monoclonais à leucotoxina (TSAI *et al.*, 1984).

Estudos durante a década de 80 revelaram que havia variações na produção de leucotoxina entre diferentes isolados (ZAMBON *et al.*, 1983a). Mais tarde, Brogan e colaboradores (1994) também verificaram variações semelhantes e elucidaram o mecanismo responsável pela variação na produção de leucotoxina, ficando evidente que, cepas que apresentavam alta leucotoxicidade apresentavam uma deleção de 530 pb no operon da

leucotoxina. Estas cepas que produzem grandes quantidades de leucotoxina têm sido relacionadas com indivíduos de famílias com histórico de periodontite agressiva (MOMBELLI, 1999; HARASZTHY *et al.*, 2000).

Altos níveis de leucotoxina são produzidos durante a fase de crescimento ativo, sendo que, a produção decresce substancialmente quando as células se aproximam da fase estacionária se a bactéria estiver sendo cultivada em condições anaeróbicas, sugerindo que o operon da leucotoxina responde ao estímulo ambiental (SPITZNAGEL; KRAIG; KOLODRUBETZ, 1995).

Estudos demonstraram que a produção de leucotoxina é regulada pelo oxigênio (SPITZNAGEL *et al.*, 1995; HRITZ *et al.*, 1996; KOLODRUBETZ *et al.*, 2003;), mas muito pouco é conhecido sobre outros fatores que poderiam regular a produção e/ou secreção de leucotoxina.

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

Em função desta recente descoberta, levantou-se a hipótese de que a produção de leucotoxina seria regulada também pelo ferro, uma vez que, outras proteínas envolvidas na captação e metabolismo do ferro são também reguladas por ele. Dessa forma, seguindo este raciocínio, Balashova e colaboradores (2006) demonstraram que a secreção de leucotoxina é severamente afetada pela presença de ferro livre no meio. Esta foi a primeira comprovação da regulação da produção/liberação de leucotoxina mediada pelo ferro.

Monócitos/macrófagos humanos, em contraste com neutrófilos e linfócitos, são lisados por um mecanismo que envolve a ativação da caspase-1 e a secreção da IL-1 β bioativa pela leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* (KELK *et al.*, 2003; 2005). Este processo representa um recém descoberto mecanismo de morte celular chamada piroptose, que é descrita como uma morte celular programada caspase-1-dependente (FINK & COOKSON, 2006). A habilidade de cepas de produzir leucotoxina tem sido correlacionada com a instalação e progressão da doença (BUENO *et al.*, 1998; HARASZTHY *et al.*, 2000; HAUBEK *et al.*, 2001; HAUBEK & WESTERGAARD, 2004).

A perda do osso alveolar é causada por um aumento local na formação e ativação de osteoclastos (TAUBMAN & KAWAI, 2001), e sua diferenciação pode ser parcialmente causada por citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 (LERNER, 2004). A

expressão elevada de IL-1 no tecido periodontal e concentrações aumentadas dessa citocina no fluido gengival, estão relacionados com a progressão da doença (ROBERTS *et al.*, 1997; McGEE *et al.*, 1998; GRAVALLESE & GOLDRING, 2000; RASMUSSEN *et al.*, 2000). Em modelos primatas de periodontite experimental, antagonista de IL-1, inibiu a perda óssea a inflamação (ASSUMA *et al.*, 1998; DeLIMA *et al.*, 2001, 2002;).

Macrófagos participam tanto da resposta imune inespecífica quanto da específica, nesta última participam via apresentação de antígenos e liberação de IL-1, sendo principal fonte de IL-1 no tecido inflamado. IL-1 β é produzida na forma de um precursor inativo, pró-IL-1 β e necessita ser ativada por uma enzima específica, caspase-1. Esta enzima é uma cisteína proteinase e é responsável pela ativação e secreção de IL-1 β . Muitos produtos bacterianos como o lipopolissacarídeo (LPS) são conhecidos por aumentar a expressão de pró-IL-1 β em macrófagos. Contudo, um estímulo secundário é necessário para a secreção substancial de IL-1 bioativa (THORNBERRY *et al.*, 1992).

Recentemente, foi demonstrado que a leucotoxina purificada de *A. actinomycetemcomitans* ativa caspase-1 em monócitos/macrófagos humanos *in vitro* e conseqüentemente promove a secreção de IL-1 β (KELK *et al.*, 2003, 2005).

A leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans*, assim como a leucotoxina de *M. haemolytica*, é um membro de da família de toxinas RTX que age contra granulócitos e linfócitos de humanos e macacos do continente europeu (LALLY *et al.*, 1999). A leucotoxina de Aa (LtxA) tem a organização genética e os domínios estrutural e funcional similares a da *M. haemolytica*. LtxA apresenta de 40-50 % de homologia (em relação à seqüência de aminoácidos) com a hemolisina de *E. coli* (HlyA) e com a leucotoxina de *M. haemolytica* (LktA). Os domínios repetidos contêm múltiplas cópias de seqüências que parecem ser importantes para a atividade citolítica.

O domínio hidrofóbico na região N-terminal das toxinas RTX, além de ser conservada, é provavelmente a região que expande a membrana celular das células do hospedeiro causando a formação dos poros. Primeiramente pensava-se que a leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* não era secretada, mas sim, associada à superfície celular (LALLY *et al.*, 1991; OHTA *et al.*, 1991). Porém, estudos demonstraram que certas cepas de *A. actinomycetemcomitans* que são lisas (não-aderentes), incluindo a JP2, que produz um alto nível de leucotoxina, liberam altos níveis de leucotoxina no sobrenadante da cultura durante os primeiros estágios de crescimento (KACHLANY *et al.*, 2000).

O gene da leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* foi clonado e expresso em *E. coli* por Kolodrubetz e colaboradores (1989). Lally *et al.* (1991) além da clonagem,

determinaram a seqüência inteira de quatro genes relacionados e descreveram que o gene *ltxA* codificava a proteína. Sugeriram também que os produtos dos genes *ltxB*, *ltxC* e *ltxD* estavam envolvidos na modificação pós-translacional da membrana, translocação e inserção. O papel de transporte dos genes *ltxB* e *ltxD* foram determinados através de mutações. Os mutantes produziram níveis significativamente menores de leucotoxina, embora a quantidade de RNAm fosse compatível a quantidade apresentada por cepas selvagens (não mutantes). Os autores propuseram que a queda dos níveis de leucotoxina era um efeito indireto da localização errada dos genes mutantes *ltxB*-e *ltxD*-(GUTHMILLER *et al.*,1995). Estudos envolvendo a produção de híbrido da leucotoxina com a HlyA de *E. coli* e a produção de anticorpos monoclonais específicos contra várias regiões da proteína LtxA permitiram aos autores determinar a relação entre a estrutura e a função de vários domínios desta proteína. A estrutura funcional de leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* possui uma íntima correlação com a estrutura da leucotoxina de *M. haemolytica*. Tem sido demonstrado que a região repetida rica em glicina presente na leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* interfere na ligação específica de alta afinidade com moléculas de β 2-integrina da superfície de células hospedeiras, dessa forma definindo o “local” no hospedeiro para esta toxina (LALLY *et al.*, 1999).

2.2.2 Anticorpos Específicos

Muitos estudos visaram avaliar a eficácia da utilização de parâmetros clínicos e laboratoriais para diagnosticar a doença periodontal.

O aumento na frequência de detecção e no nível de anticorpos específicos a determinados microrganismos têm sido considerado uma importante ferramenta para o diagnóstico e monitoramento de doença periodontal (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1990).

Embora alguns trabalhos não tenham identificado relação entre os níveis de anticorpos contra *A. actinomycetemcomitans* e o desenvolvimento de periodontite (HIDALGO *et al.*, 1998), outros estabelecem essa relação. Ebersole *et al.* (1982) demonstraram que indivíduos com periodontite agressiva localizada apresentavam níveis aumentados de anticorpos contra *A. actinomycetemcomitans* quando comparados à indivíduos periodontalmente saudáveis. Estes mesmos autores, em estudo posterior descreveram um aumento significativo nos níveis de IgG contra *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b em 90% dos pacientes com PAL, em 40% dos indivíduos com PAG e apenas 25% dos pacientes com

PC (EBERSOLE *et al.*, 1990). Outros trabalhos envolvendo a população americana apontaram uma forte associação entre os níveis destes anticorpos específicos (especialmente sorotipo b) e a PAL (FARIDA *et al.*, 1986; VINCENTI *et al.*, 1985). Gmür e Baehni (1997) demonstraram uma alta prevalência de níveis aumentados de anticorpos contra *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b em um grupo etnograficamente heterogêneo de jovens com periodontite na Europa. Outro trabalho, realizado no Brasil, revelou que esse aumento também era observado em pacientes com Síndrome de Down diagnosticados com periodontite (SANTOS *et al.*, 1996).

A pesquisa de anticorpos específicos a leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* também têm sido alvo de estudos, Nagakawa e colaboradores (2001) utilizaram leucotoxina semi purificada em coluna *Sephadex* G-200, para verificar a presença de anticorpos contra esta proteína no soro de pacientes com PAL. Os resultados obtidos por ELISA clássico demonstraram um nível sérico de IgG (anti-leucotoxina) significativamente maior em pacientes com PAL em relação aos soros de indivíduos periodontalmente saudáveis. O mesmo ocorreu quando analisados por ELISA captura.

2.2.3 Modelo Experimental de Doença Peridontal em Camundongos

A patogênese da doença periodontal envolve fatores mecânicos e biológicos, dentre os quais citocinas, fatores quimiotáticos e células inflamatórias exercem papéis importantes na sua progressão. Garlet e colaboradores (2005) caracterizaram a evolução da doença periodontal induzida por *A. actinomycetemcomitans* em camundongos, mostrando que a inoculação bucal dessa bactéria promove a migração de leucócitos para o tecido periodontal e o desenvolvimento de reabsorção do osso alveolar. Nesse estudo, também revelaram a expressão de citocinas pró-inflamatórias do tipo-Th1 incluindo TNF- α , INF- γ e IL-12 em tecido periodontais após a infecção desde estágios iniciais e que se mantém no decorrer da doença. Cinética similar de expressão foi encontrada para as quimiocinas CCL5, CCL4, CCL3 e CXCL10 e para os receptores CCR5 e CXCR3, todos esses ligados ao padrão Th1. A expressão de mediadores tipo-Th2, como IL-10, CCL1 e seus receptores CCR4 e CCR8 foram detectadas somente após 30 dias da infecção, determinando uma resposta imune tempo-dependente. A expressão de quimiocinas estava diretamente relacionada à presença de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, linfócitos CD4 e CD8 e linfócitos B no infiltrado inflamatório.

Garlet e colaboradores (2005) também demonstraram que durante o predomínio da resposta tipo Th1, há um aumento no número de células inflamatórias e intensa perda óssea. Em contraste, após o aumento da expressão de mediadores tipo Th2, o número de células inflamatórias permanece constante. Os dados deste estudo, apontam que camundongos sujeitos a inoculação bucal de *A. actinomycetemcomitans* representam um modelo adequado para o estudo da doença periodontal. Sugerem também que, a expressão de citocinas e quimiocinas pode dirigir o recrutamento seletivo de subpopulações leucocitárias para o tecido periodontal, o que pode determinar o estacionamento ou progressão natural da lesão.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar nível de leucotoxina e avaliar a resposta imune humoral específica em camundongos infectados com *A. actinomycetemcomitans*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter antígenos solúveis de *A. actinomycetemcomitans*;
- Fracionar antígenos de *A. actinomycetemcomitans* através de cromatografia de gel filtração;
- Analisar o nível de IgG anti-leucotoxina no decorrer de infecção bucal de camundongos BALB/c com *A. actinomycetemcomitans*.
- Analisar o nível de imuno complexo leucotoxina-IgG anti-leucotoxina circulante no decorrer de infecção bucal de camundongos BALB/c com *A. actinomycetemcomitans*.
- Analisar nível de microrganismo e/ou leucotoxina em órgãos/ tecidos no decorrer de infecção bucal de camundongos BALB/c com *A. actinomycetemcomitans*.

4 REFERÊNCIAS

- ASSUMA, R.; OATES, T.; COCHRAN, D.; AMAR, S.; GRAVES, D.T. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. **J Immunol**, v. 160, p. 403-409, 1998.
- AVILA-CAMPOS, M.J.; VELÁSQUEZ-MELENDZ, G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in São Paulo, SP, Brazil, **Rev Inst Trop**, v.44, p. 1-5, 2002.
- BAEHNI, P.; TSAI, C.C.; McARTHUR, W.P.; HAMMOND, B.F. TAICHMAN, N.S. Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. VIII. Detection of leukotoxic activity of a plaque-derived gram-negative microorganism. **Infect Immun**, v.24, p. 233-243, 1979.
- BALASHOVA, N.V.; CROSBY, J.A.; AL GOFAILY, L.; KACHLANY, S.C. Leukotoxin confers beta-hemolytic activity to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect Immun**, v.74, p. 2015-2021, 2006.
- BROGAN, J.M, LALLY, E.T.; POULSEN, K.; KILIAN, M.; DEMUTH, D.R. Regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin expression: analysis of promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. **Infect Immun**, v. 62, p. 501-508, 1994.
- BUENO, L.C.; MAYER, M.P.; DiRIENZO, J.M. Relationship between conversion of localized juvenile periodontitis-susceptible children from health to disease and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin promoter structure. **J Periodontol**, v. 69, p. 998-1007, 1998.
- CHUNG, C.P., LEE, Y.K., CHOI, S.S., NISENGARD, R.J. Antibodies to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a Korean population. **J Periodontol**, v. 57, p. 510-515, 1989.
- CORTELLI, J. R.; CORTELLI, S. C.; JORDAN, S.; HARASZTHY, V. I.; ZAMBON, J. J. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 32, p. 860-866, 2005.
- CORTELLI, J.R.; CORTELLI, S.C.; PALLOS, D.; JORGE, A.O.C. Prevalence of aggressive periodontitis in adolescents and Young adults from Vale do Paraíba. **Pesq Odontol Bras**, v. 16, p. 163-168, 2002.
- DELIMA, A.J.; OATES, T.; ASSUMA, R.; SCHWARTZ, Z.; COCHRAN, D.; AMAR, S.; GRAVES, D.T. Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 28, p. 233-240, 2001.
- DELIMA, A.J.; KARATZAS, S.; AMAR, S.; GRAVES, D.T. Inflammatory and tissue loss caused by periodontal pathogens is reduced by interleukin-1 antagonists. **J Infect Dis**, v.186, p. 511-516, 2002.
- EBERSOLE, J.L.; TAUBAMAN, M.A.; SMITH, D.J.; SOCRANSKY, S.S. Humoral immune responses and diagnosis of human periodontal disease. **J Periodont Res**, v.17, p. 478-480, 1982.

EBERSOLE, J.L. Systemic humoral immune responses in periodontal disease. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.1, p. 283-331, 1990.

FARIDA, R.; MARSH, P.D. NEWMAN, H.N.; RULE, D.C.; IVANYI, L. Serological investigation of various forms of inflammatory periodontitis. **J Periodontol Res**, v.21, p. 365-374, 1986.

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

FINK, S.L.; COOKSON, B.T.; Caspase-1-dependete pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infect host macrophages. **Cell Microbiol**, v. 8, p. 1812-1825, 2006.

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

GMUR, R.; BAEHNI, P.C. Serum immunoglobulin G responses to various *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in a young ethnographically heterogeneous periodontitis patients group. *Oral Microbiol Immunol*, v.12, p. 1-10, 1997.

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

GRAVALLESE, E.M.; GOLDRING, S.R. Cellular mechanisms and the role of cytokines in bone erosions in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 43, p. 2143-2151, 2000.

GUTHMILLER, J.M., KOLODRUBETZ, D., KRAIG, E. Mutational analysis of the putative leukotoxin transport genes in the *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Microbiol Pathog**, v.18, p.307-321, 1995.

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

HAUBEK, D.; ENNIBI, O.K.; POULSEN, K.; POULSEN, S.; BENZARTI, N.; KILIAN, M. Early-onset periodontitis in Morocco is associated with the highly leukotoxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J Dent Res**, v. 80, p. 1580-1583, 2001.

HAUBEK, D.; WESTERGAARD, J. Detection of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (JP2) in a Moroccan immigrant family with multiple cases of localized aggressive periodontitis. **Int J Pediatr Dent**, v. 14, p. 41-48, 2004.

HIDALGO, M.M.; ITANO, E.N.; NISHIMURA, C.S.; TREVISAN Jr, W.; AVILA-CAMPOS, M.J. Avaliação da resposta imune celular em pacientes com periodontite. **Rev Odontol Univ. São Paulo**, v.12, n.2, p.121-127, 1998.

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

HRITZ, M.; FISHER, E.; DEMUTH, D.R. Differential regulation of the leukotoxin operon in highly leukotoxic and minimally leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect Immun**, v.64, p. 2724-2729, 1996.

KACHLANY, S.C; FINE, D.H.; FIGURSKI, D.H. Secretion of RTX leukotoxin by *A. actinomycetemcomitans*. **Infection and immunity**, v.68, p. 6094-6100, 2000.

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

KELK, P.; HOHANSSON, A.; CLAESSION, R.; HANSTROM, L.; KALFAS, S. Caspase1 involvement in human monocyte lysis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. **Infect Immun**. v. 71, p. 4449-4455, 2003

KELK, P.; CLAESSION, R.; HANSTROM, L.; LERNER,U.H.; KALFAS, S.; JOHANSSON, A. Abundant secretion of bioactive interleukin-1 beta by human macrophages induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. **Infect Immun**. v.73, p. 453-458. 2005

KLEIN, M.I.; GONÇALVES, R.B. Detection of *Tannerella forsytensis* and *Prophyromonas gingivalis* by polymerase chain reaction in subjects with periodontal status. **J Periodontol**, v.74, p. 798-802, 2003.

KOLODRUBETZ, D., DAILEY, T., EBERSOLE, J., KRAIG, E. Cloning and expression of the leukotoxin gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect Immun**, v.57, p.1465-1469, 1989.

KOLODRUBETZ, D.; PHILIPS, L.; JACOBS, C.; BURGUN, A.; KRAIG, E. Anaerobic regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin transcription is Arch/FnrA-independent and requires a novel promoter element. **Res Microbiol**, v. 154, p. 645-653, 2003.

LALLY, E.T.; HILL, R.B.; KIEBA, I.R.; KOROSTOFF, J. The interaction between RTX toxins and target cells. **Trends Microbiol**, v. 7, p. 356-361, 1999.

LALLY, E.T., GOLUB, E.E., KIEBA, T.R., TAICHAMAN, N.S., DECKER, S., BERTHOLD, P., GIBSON, C.W., DEMUTH, D.R., ROSENBLOOM, J. Structure and function of the ltxB and ltxD genes of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin complex. **Microbiol Pathog**. v.11, p. 111-121, 1991.

LERNER, U.H. New molecules in the tumor necrosis for physiological and pathological bone resorption. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 15, p. 64-81, 2004.

LISTGARTEN, M.A. LAI, C.H.; YOUNG, V. Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival in microbial samples from patients with refractory periodontitis. **J Periodontol**, v.64, p. 155-161, 1993.

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

McGEE, J.M.; TUCCI, M.A.; EDMUNDSON, T.P.; SERIO, C.L.; JOHNSON, R.B. The relationship between concentration of pro-inflammatory cytokines within gingiva and the adjacent sulcular depth. **J Periodontol**, v. 69, p. 865-871, 1998.

MOMBELLI, A. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Chinese adults. Serotype distribution and analysis of the leukotoxin gene promoter locus. **J Clin Periodontol**, v. 26, p. 505-510, 1999.

NAKAGAWA, R. I., GUAZELI-AMIN, V. H., HIDALGO, M. M. Anti-leukotoxin antibodies against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in serum and saliva samples from patients with localized juvenile periodontitis. **Pesq Odontol Bra.**, v.15, n.1, p.05-11. 2001.

NOVAK, M.J. Classificação das doenças e condições que afetam o periodonto. **Periodontia Clínica**, 9: 58-65, 2004.

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

OHTA, H.; MIYAGUI, A.; KATO, K.; FUKUI, K. The relationships between leukotoxin production, growth role and the bicarbonate concentration in a toxin-production-variable strain of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Microbiology**, v.142, p. 963-970, 1996.

PAGE, R.C.; SCHROEDER, H.E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. **Lab Invest**, v.33, p. 235-249, 1976.

PASTER, B.J.; BOCHES, S.K.; GALVIN, J.L.; ERICSON, R.E.; LAW, C.N.; LEVANOS, V.A.; SAHASRABUDHE, A.; DEWHIRST, F.E. Bacterial diversity in human subgingival plaque. **J Bacteriol**, v.12, p. 3770-3783, 2001.

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

RASMUSSEN, L.; HANSTROM, L.; LERNER, U.H. Characterization of bone resorbing activity in gingival crevicular fluid from patients with periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 27, p. 41-52, 2000.

ROBERTS, F.A.; HOCKETT Jr, R.D.; BUCY, R.P. MICHALEK, S.M. Quantitative assessment of inflammatory cytokine gene expression in chronic adult periodontitis. **Oral Microbiol Immun**, v.12, p. 336-344, 1997.

SANTOS, R.; SHANFELD, J.; CASAMASSIMO, P. Serum antibody responses to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Down's syndrome. **Spec Care Dent**, v. 16, p. 80-93, 1996.

SLOTS, J.; REINOLDS, H.S.; GENCO, R.J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. **Infect Immun**, v.29, p.101-1020, 1980.

SLOTS, J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. **Oral Microbiol Immunol**, v. 1, p. 48-55, 1986.

SLOTS, J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. In; NISENGARD, R.J. & NEWMAN, M.G **Oral Microbiol Immunol**, Philadelphia, P.A.; Saunders, p.218-227, 1994.

SLOTS, J.; TING, M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. **Periodontol 2000**, v.20, p.81-121, 1999.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Microbiological risk factors for destructive periodontal disease. **Chapel Hill: University of North Carolina Dental Ecology**, p. 79-90, 1990.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. **Periodontol 2000**, v. 5, p. 7-25, 1994.

SPITZNAGEL, J.; KRAIG Jr, E.; KOLODRUBETZ, D. The regulation of leukotoxin production in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain JP2. **Adv Dent Res**,v. 9, p. 48-54, 1995.

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

TAICHMAN, N.S.; DEAN, R.T.; SANDERSON, C.J. Biochemical and morphological characterization of the killing of human monocytes by a leukotoxin derived from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect Immun**, v.28, n.1, p.258-268, 1980.

TAKEUCHI, Y.; UMEDQA, M.; SAKAMOTO, M.; BUENNO, Y.; HUANG, Y.; ISHIKAWA, I. *Treponema socranskii*, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. **J Periodontol**, v. 72, p. 1354-1363, 2001.

TAUBAMAN, M.A.; KAWAI, T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease in direct and indirect induction of bone resorption. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 12, p. 125-135, 2001.

THORNBERRY, N.A.; BULL, H.G.; CALAYCAY, J.R.; CHAPMAN, K.T.; HOWARD, A.D.; KOSTURA, M.J.; MILLER, D.K.; MOLINEAUX, S.M.; WEIDNER, J.R.; AUNINS, J.; ELLISTON, K.E.; AYALA, J.M.; CASANO, F.J.; CHIN, J.; DING, G.J.; EGGER, L.A.; GAFFNEY, E.P.; LIMJUCO, G.; PALHYA, O.C.; RAJU, S.M.; ROLANDO, A.M.; SALLEY, J.P.; YAMIM, T.T.; LEE, T.D.; SHIVELY, J.E.; MacCROSS, M.; MUNFORD, R.A.; SCHMIDT, J.A.; TOCCI, M.J. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta progressing in monocytes. **Nature**, v.356, p. 768-774, 1992.

TRAN, S.D.; RUDNEY, J.D.; SPARKS, B.S.; HODGES, J.S. Persistent presence of *Bacteroides forsythus* as a risk factor for attachment loss in a population with low prevalence and of adult periodontitis. **J Periodontol**, v. 72, p. 1-10, 2001.

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

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

VAN WINKELHOFF, A.J.; de GROOT, P.; ABBAS, F.; de GRAAF, J. Quantitative aspects of the subgingival distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a patient with localized juvenile periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 21, p. 199-202, 1994.

VAN WINKELHOFF, A.J.; LOOS, B.G.; VAN DER REIJIDEN, W.A., VAN DER VELDEN, V. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. **J Clin Periodontol**, v. 29, p. 1023-1028, 2002.

VINCENTI, J.W.; SUZUKI, J.B.; FALKLER Jr, W.A.; CORNETT, W.C. Reaction of human sera from juvenile periodontitis, rapidly progressive periodontitis and adults periodontitis patients with selected periodontopathogens. **J Periodontol**, v. 56, p. 464-469, 1985.

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

ZAMBON, J.J.; SLOTS, J.; GENCO, R.J. Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. **Infect Immun**, v.41, p.19-27, 1983b.

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

ZAMBON, J.J. Periodontal disease: Microbial factors. **Annals of Periodontology**, v.1, p. 879-925, 1996.

5.ARTIGO

5.1 TÍTULO: INFECÇÃO BUCAL, NÍVEL DE LEUCOTOXINA LOCALIZADA E SISTÊMICA E, RESPOSTA IMUNE HUMORAL A LEUCOTOXINA DE *AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS* EM CAMUNDONGO

INFECÇÃO BUCAL, NÍVEL DE LEUCOTOXINA LOCALIZADA E SISTÊMICA E, RESPOSTA IMUNE
HUMORAL A LEUCOTOXINA DE *AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS* EM
CAMUNDONGO

5.2 RESUMO

Aggregatibacter actinomycetemcomitans é um cocobacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, freqüentemente produtor de leucotoxina e associado a periodontites. Dados recentes evidenciam possível ligação entre essa bactéria e doenças cardiovasculares. O presente trabalho teve como objetivo avaliar nível de leucotoxina em camundongos infectados por inoculação bucal de *A. actinomycetemcomitans* e avaliar a resposta imune humoral específica. Foram utilizados camundongos BALB/c infectados por inoculação bucal de *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 43718 sorotipo b) e os níveis plasmáticos de IgG anti-leucotoxina e de leucotoxina em tecido palatal, cardíaco e esplênico avaliados por ELISA indireto e ELISA captura, respectivamente, nos dias 15, 30 e 60 pós-infecção. Os resultados obtidos demonstraram níveis plasmáticos de IgG anti-leucotoxina significativamente elevados nos animais com 15, 30 e 60 dias pós-infecção em relação ao grupo não infectado. Aumento significativo no nível de leucotoxina também foi observado em amostras de tecido palatal, cardíaco e esplênico. Análise adicional de imuno complexo circulante (IC) por ELISA evidenciou aumento no nível de IC nos animais infectados o que pode ter contribuído para a neutralização das IgG anti-leucotoxina. Com os resultados obtidos pode-se concluir que em camundongos BALB/c a inoculação bucal com *A. actinomycetemcomitans* induz aumento no nível plasmático de IgG anti-leucotoxina; é possível detectar leucotoxina em tecido infectado por meio de ELISA captura e possivelmente ocorre a disseminação de *A. actinomycetemcomitans* ou de leucotoxina de tecido bucal para tecido cardíaco e esplênico.

Palavras-chave: IgG. ELISA. Periodontite agressiva. Leucotoxina. Imunocomplexo.

5.3 ABSTRACT

Aggregatibacter actinomycetemcomitans is a facultative anaerobic Gram-negative coccus-bacillus frequently leukotoxin producer and associated with periodontitis. Recent data evidence a possible connection between this bacteria and cardiovascular diseases. This present paper has as objective to investigate the specific humoral immune response and to detect leukotoxin in mice infected by *A. actinomycetemcomitans*. BALB/c mice were infected with *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 43718 “b” serotype) by oral inoculation and plasmatic level of anti-leukotoxin IgG and leukotoxin in palatal, cardiac and splenic tissues were valued by indirect ELISA and capture ELISA, respectively, at 15, 30 and 60 days post-infection. The results showed increased plasmatic levels of anti-leukotoxin IgG in infected mice in all periods (15, 30 and 60 days) in relation to control not infected. Also increased leukotoxin level in palatal, cardiac and splenic samples tissues was observed. The additional circulating immune complex (IC) analysis by ELISA demonstrated an IC increased level in infected animals, suggesting that it could be contributed to anti-leukotoxin IgG neutralization.

In conclusion, BALB/c mice infected with *A. actinomycetemcomitans* by oral inoculation induce anti-leukotoxin IgG increased plasmatic level, leukotoxin present in tissues can be detected by ELISA capture and it is possible to occur that *A. actinomycetemcomitans* or leukotoxin from oral tissue disseminate to cardiac and splenic tissues.

Keywords: IgG. ELISA. Aggressive periodontitis. Leukotoxin. Immune complex.

5.4 INTRODUÇÃO

Aggregatibacter actinomycetemcomitans freqüentemente associado a quadros de periodontite, é um cocobacilo, Gram-negativo, microaerófilo (5 a 10% CO₂), fermentativo e produtor de catalase (ZAMBON, 1985).

Um dos fatores de virulência de *A. actinomycetemcomitans* mais investigado é a leucotoxina que é uma proteína hidrossolúvel, termolábil, com massa molecular (MM) de aproximadamente 115-180 kDa, com capacidade tóxica sobre monócitos, polimorfonucleares e macrófagos humanos, e atuarem em linhagens celulares tais como Jurkat e P3U1 (ZAMBON, 1985; NAKAGAWA, 2000).

Esse cocobacilo tem sido isolado com maior freqüência de diversos quadros de periodontites (CHRISTERSSON *et al.*, 1987; VAN-STEENBERGEN *et al.*, 1994) e há uma forte correlação entre a perda do ligamento do tecido periodontal e a grande proporção de *A. actinomycetemcomitans* nos locais afetados (VAN WINKELHOFF *et al.*, 1994). Também tem sido isolado de abscessos abdominais, cerebrais e faciais (TOWNSEND & GILLENWALTER, 1969), de endocardites (KAPLAN *et al.*, 2001), de infecção pulmonar, de abscesso de glândula tireóide, de infecções do trato urinário, de osteomielite vertebral (SLOTS, 1994; ZAMBON, 1997) e de amostras de placas ateroscleróticas, sugerindo que há uma ligação entre a bactéria e doenças cardiovasculares (HARASZTHY *et al.*, 2000).

Garlet e colaboradores (2005) caracterizaram a evolução da doença periodontal induzida por *A. actinomycetemcomitans* em camundongos, mostrando que a inoculação bucal dessa bactéria promove a migração de leucócitos para o tecido periodontal e o desenvolvimento de reabsorção do osso alveolar.

A partir dos resultados obtidos por Garlet e colaboradores (2005), é possível considerar que camundongos sujeitos a inoculação bucal de *A. actinomycetemcomitans* representam um modelo adequado para o estudo da doença periodontal. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a resposta imune humoral específica bem como detectar a

leucotoxina em camundongos BALB/c infectados bucalmente com *A. actinomycetemcomitans*.

5.5 MATERIAL E MÉTODOS

5.5.1 Microrganismo

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (ATCC 43718 sorotipo b) foi cultivado sob condições de microaerofilia em ágar-soja-tripticaseína acrescido de bacitracina e vancomicina (TSBV), como previamente descrito (AVILA-CAMPOS *et al.*, 1988) para a posterior infecção dos camundongos. Paralelamente, a bactéria também foi cultivada em caldo infuso cérebro-coração (BHI) suplementado com 0,5% de extrato de levedura em condições de microaerofilia e incubada a 37 °C por 72 horas, para obtenção de extrato sonicado.

5.5.2 Animais

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

5.5.3 Obtenção de Extrato Sonicado

Amostras de extrato sonicado foram obtidas por meio de centrifugação de *A. actinomycetemcomitans* (centrífuga: Himac CR 21: Hitachi, Japão) a 18.000 rpm durante 20 min, a 4°C, seguida de 3 lavagens em solução salina-fosfato tamponada (PBS), 0,15M, pH 7,2. Após re-suspensão em PBS foi sonicada segundo Susuki e colaboradores (1984), e modificado quanto ao número e duração dos ciclos necessários, que foram em média de 30 (50 volts), de um minuto ligado com intervalo de 2 minutos desligados em tubo imerso em gelo triturado. A ruptura das células foi verificada por microscopia e a suspensão sonicada centrifugada a 18.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Lowry e colaboradores (1951). Os extratos foram alíquotados e armazenados a -80°C.

5.5.4 Cromatografia em Coluna *Sephadex* G-200

Amostras de 2 ml de extratos sonicados de *A.actinomycetemcomitans* ATCC 43718 foram aplicadas em coluna de *Sephadex* G200 (2 X 50 cm) equilibrada com PBS. Frações foram separadas por meio de um coletor automático de frações (1ml em cada tubo) e analisadas em espectrofotômetro (Ultrospec-200 Pharmacia Biotech UV/Visible) a 280 nm. Foi considerada como fração contendo a leucotoxina as frações de aproximadamente 150 kDa baseado em resultados obtidos anteriormente (GUAZELI-AMIN,1998, NAKAGAWA *et al.*, 2001).

5.5.5 Infecção de Camundongos com *A. actinomycetemcomitans* (Aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal/UEL – CEEA nº68/07)

Camundongos (n = 24) foram divididos em quatro grupos: GRUPO I: infectado com *A. actinomycetemcomitans* e sacrificados após 15 dias da última inoculação; GRUPO II: infectado e sacrificado após 30 dias da última inoculação; GRUPO III: infectado e sacrificado após 60 dias da última inoculação e GRUPO IV: controle, não infectado (inoculados com PBS estéril) e sacrificados 15, 30 e 60 dias pós-inoculação (2 cada período). Inicialmente, os animais receberam uma injeção direta de 1×10^9 células de *A. actinomycetemcomitans* diluídas em 10 μ l de PBS na gengiva palatina do segundo molar. Imediatamente após, 1×10^9 células de *A. actinomycetemcomitans* diluídas em 100 μ l de PBS foram colocadas na cavidade oral do camundongo, sendo este procedimento foi repetido após 48 e 96 horas. Os controles foram submetidos ao mesmo procedimento com PBS (acordo com Garlet *et al.*, 2005). Após o período acima, foram coletadas amostras de sangue e a seguir eutanasiados com éter etílico para a retirada de órgãos: coração, baço, cérebro e palato.

5.5.6 Obtenção dos Anticorpos Policlonais Anti-leucotoxina *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718

Amostras de 200 μ g de leucotoxina (fração I -coluna G200) de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 foram inoculadas subcutaneamente em coelhos. A primeira imunização foi realizada com adjuvante completo de Freund, utilizando 800 μ l dele para 800 μ l de leucotoxina, e depois a intervalos de duas semanas (2° e 3° dose) utilizando

adjuvante incompleto. A partir da amostra de soro imune foi purificada a IgG por meio de cromatografia em coluna de *Sepharose* proteína G (KAMIJI, 2007), seguida de dosagem de proteína pelo método Lowry e colaboradores. (1951).

5.5.7 Obtenção dos Anticorpos Monoclonais Anti-leucotoxina *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718

Camundongos BALB/c (fêmeas) foram inoculadas com as frações de leucotoxina semi purificada (137 µg de proteína/100 µL). Os antígenos foram emulsificados com adjuvante incompleto de Freund e utilizados em três inoculações subcutâneas com intervalos de quinze dias. Após este período, foi realizada uma sangria de prova e o soro foi analisado por *dot blotting*. Uma nova inoculação foi realizada, desta vez, por via endovenosa. As células P3U1 foram fundidas com células de baço de camundongos imunizados com leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 por meio de Polietilenoglicol, selecionadas e clonadas por diluição limitante. Após expansão em cultura ou ascite, os anticorpos monoclonais anti-leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* foram fracionados em coluna de *Sepharose* proteína G (OSHIRO, 2005).

5.5.8 Análise de Reatividade dos Anticorpos Monoclonais e Policlonais Anti-leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* às Frações de Cromatografia

Placas de ELISA de 96 orifícios foram sensibilizadas com 50 µl de cada fração (*Sephadex*) diluídas com 100 µl de tampão carbonato-bicarbonato, em duplicata, incubada a 37°C por 1 h e seguida de 18 h a 4°C. Após bloqueio por 1 h (leite desnatado 5% e Tween 20 0,5%, diluído em PBS) e lavagens (leite desnatado 0,5% diluído em PBS e Tween a 0,05%), foram incubadas por 2 h a 37°C com IgG monoclonal anti-leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans*, e posteriormente, com 100 µl de conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo (A-8924, SIGMA®), para anticorpos monoclonais. Para a análise de anticorpos policlonais, foi adicionada anticorpos de coelho e conjugado peroxidase anti-IgG de coelho. Após lavagem, foram adicionados 100 µl de solução reveladora e a reação foi interrompida após 30 min com 50 µl de solução ácido sulfúrico 4N. A leitura da placa foi realizada em leitor ELISA Multiskan EX (Uniscience – Labsystems) a $\lambda=492\text{nm}$.

5.5.9 Detecção de *A. actinomycetemcomitans* em Amostras de Coração Amostras de Coração

Amostras de coração foram macerados com 400 µl de PBS estéril em placa de 24 orifícios utilizando gaze e êmbolo de seringa estéril descartável de 3 ml. 80 µl de cada amostra foi semeada em TSBV e mantido sob condições de microaerofilia, a 37°C, por 72 h. E então, foi feita a contagem das colônias. O restante das amostras de coração coletadas foi utilizado posteriormente para ELISA captura.

5.5.10 Análise de IgG Anti-leucotoxina Plasmática de *A. actinomycetemcomitans* por ELISA

A placa de ELISA foi sensibilizada com 100 µl/pocinho de fração de leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* (12.5µg/ml diluído em tampão carbonato-bicarbonato e incubada a 37°C por 1 h, seguida de 18 h a 4°C). Após o bloqueio por 1 h à temperatura ambiente, foi seguido de 4 lavagens. Posteriormente, a placa foi incubada com amostras de plasma (1:400) em duplicata e incubadas a 37°C por 2 h. Após a incubação e as quatro lavagens da placa, foi adicionado 100 µl do conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo (Sigma A8924) diluído em tampão diluição (1: 12.000) e incubados por 2 h a 37°C. A revelação foi realizada com o OPD e paralisada com solução de ácido sulfúrico 4N. A leitura da placa foi realizada em leitor ELISA Multiskan EX (Uniscience – Labsystems) a $\lambda = 492\text{nm}$.

5.5.11 Análise de Imuno Complexo Plasmático por ELISA

A sensibilização da placa de ELISA foi realizada com a imunoglobulina G de coelho anti-leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* na concentração de 25 µg/ml diluído em tampão carbonato-bicarbonato (100 µl/pocinho) e incubada a 37°C por 1 h, seguida de 18 h a 4°C. Após o bloqueio por 1 h à temperatura ambiente, foi seguido de 4 lavagens. Posteriormente, a placa foi incubada com amostras do plasma dos camundongos, diluídas 1:10 em tampão diluição, em duplicata e incubadas a 37°C por 2 h. Após a incubação e as lavagens, foi adicionado 100 µl do conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo (Sigma A8924) diluído (1: 12.000) e incubados por 2 h a 37°C, seguida de mesmo procedimento do item anterior.

5.5.12 ELISA Captura para Detecção de Antígeno em Órgãos

Inicialmente as amostras de órgãos foram macerados com 400 µl de PBS estéril em placa de 24 orifícios utilizando gaze e êmbolo de seringa estéril descartável de 3 ml. Os sobrenadantes foram coletados para análise. A sensibilização da placa de ELISA foi realizada com a imunoglobulina G de coelho anti-leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* na concentração de 100 ng/ml diluído em tampão carbonato-bicarbonato (100 µl/pocinho) e incubada a 37°C por 1 h, seguida de 18 h a 4°C. Após o bloqueio por 1 h à temperatura ambiente, foi seguido de 4 lavagens. Posteriormente, a placa foi incubada com amostras (100 µl) dos órgãos macerados em triplicata e incubadas a 37°C por 2 h. Realizadas novas lavagens, a placa foi incubada com a IgG anti-leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* monoclonal na diluição de 600 ng/ml e incubado a 37°C por 2 h, seguida de mesmo procedimento do item anterior.

5.5.13 Análise Estatística

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

5.6 RESULTADOS

5.6.1 Análise de Reatividade dos Anticorpos Monoclonais e Policlonais Anti-leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* às frações de Cromatografia

O processo de fracionamento de 3 ml de leucotoxina parcialmente purificada através de coluna *Sephadex* G-200 resultou no perfil espectrofotométrico mostrado na Figura 1, apresentando reatividade com anticorpos monoclonais e policlonais, por ELISA, para as frações 3 a 18.

5.6.2 Detecção de *A. actinomycetemcomitans* em Amostras de Coração

Os resultados obtidos demonstram a presença de *A. actinomycetemcomitans* em todas as amostras de coração analisadas (Tabela 1).

5.6.3 Análise de IgG Anti-leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* no Plasma

Os resultados obtidos demonstraram nível elevado de IgG anti-leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* em amostras de plasma de animais infectados em relação aos animais não infectados, sendo a diferença estatisticamente significativa para todos os grupos (Figura 2).

5.6.4 Análise de Imuno Complexo no Plasma

Os resultados obtidos demonstraram nível elevado de IC em amostras de plasma de animais infectados em relação aos animais não infectados, sendo a diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle em relação ao grupo 15 e 60 dias pós-infecção. (Figura 3).

5.6.5 Análise da Infecção por meio de Detecção de Leucotoxina em Amostras de Mucosa / Gengiva Palatina

Os resultados obtidos demonstraram nível elevado de leucotoxina em amostras de mucosa/gengiva palatina de animais infectados em relação aos animais não infectados, sendo a diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle em relação ao grupo 15, 30 e 60 dias pós-infecção (Figura 4).

5.6.6 Detecção de Leucotoxina em Amostras de Coração e Baço

Os resultados obtidos demonstraram nível elevado de leucotoxina tanto em amostras de coração como de baço de animais infectados em relação aos animais não infectados, sendo a diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle em relação ao grupo 15, 30 e 60 dias pós-infecção (Figuras 5 e 6).

5.7 DISCUSSÃO

A utilização de modelo animal para investigação de doença periodontal é escasso, principalmente quando associado ao microrganismo *A. actinomycetemcomitans*. Garlet e colaboradores, (2005) desenvolveram doença periodontal em camundongos

(C57BL/6) por inoculação bucal de *A. actinomycetemcomitans* para investigação de quimiocinas.

O presente trabalho utilizou a mesma metodologia e avaliou resposta imune humoral específica bem como detectou a presença de leucotoxina circulante em camundongos BALB/c. Para isso, foi utilizada a leucotoxina obtida por fracionamento em coluna Sephadex G-200 apresentado resultados concordantes com as frações obtidas por Guazeli-Amin e colaboradores (1998). Os níveis plasmáticos de IgG anti-leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* foram significativamente elevados nos animais infectados em relação ao não infectados. Esses resultados estão de acordo com os dados de aumento no nível de anticorpos a leucotoxina em pacientes com periodontites (NAKAGAWA, 2000). No entanto não houve aumento significativo no nível de anticorpos no decorrer da infecção (15, 30 e 60 dias pós-infecção). Esse resultado poderia ser decorrente de neutralização de anticorpos pelos antígenos circulantes, formando imuno complexos (IC). A contagem de IC circulante demonstrou aumento no nível de IC no período avaliado, porém significativo apenas nos dias 15 e 60 dias pós-infecção. Possivelmente a não significância em um período seja devido a pequena amostragem utilizada. Assim, um dos fatores que devem ter contribuído para a manutenção no nível inalterado de anticorpos seja a formação de IC circulante. Porém, existe também a possibilidade de ter ocorrido algum mecanismo de controle evitando o aumento no nível de anticorpos pela ação imunossupressora de *A. actinomycetemcomitans*.

A. actinomycetemcomitans além de produzir uma proteína de 60 kDa com capacidade de inibir a síntese de IgG e IgM pelos linfócitos (SHENKER *et al.*; 1990), possui enzimas proteolíticas capazes de clivar *in vitro* imunoglobulina G (IgG), IgA e IgM (GREGORY *et al.*, 1992). Apresentam também a atuação indireta da toxina citolética (Cdt) que induz apoptose de linfócitos T humanos ativados (CELLEN *et al.*, 2006) e a ação de leucotoxina que em altas concentrações também podem eliminar os linfócitos T tanto por necrose como por apoptose (MANGAN, 1991).

A detecção de antígenos tem sido utilizada como meio de diagnóstico e acompanhamento de diversas doenças infecciosas (MIURA *et al.*, 2001; MARQUES-DASILVA *et al.*, 2003). No presente trabalho foi introduzida a detecção de leucotoxina pela metodologia de ELISA captura padronizada previamente (KAMIJI, 2007). Por essa metodologia foi observado aumento no nível de leucotoxina em amostras de mucosa/gengiva palatina de animais infectados em relação aos não infectados, evidenciando dessa forma a efetividade da metodologia empregada. A infecção pelo *A. actinomycetemcomitans* deve ter

permanecido durante o período avaliado, considerado aumento significativo de leucotoxina mesmo após 30 e 60 dias pós-infecção.

A. actinomycetemcomitans pode ser responsável por infecções não-bucais incluindo endocardites (VAN WINKELHOFF *et al.*, 1994) e tem sido detectado em amostras de placas ateroscleróticas, sugerindo que há uma relação entre a bactéria e as doenças cardiovasculares (HARASZTHY *et al.*, 2000). Considerando assim a possibilidade ocorrer disseminação do microrganismo, o presente trabalho investigou também os tecidos cardíaco e esplênico. Os resultados obtidos evidenciaram o aumento significativo no nível de leucotoxina em tecido cardíaco e esplênico, sugerindo a disseminação de *A. actinomycetemcomitans* da mucosa bucal para outros tecidos. No entanto a análise de amostras de cérebro não evidenciou a presença de leucotoxina (dados não demonstrados), possivelmente pela barreira hemato-encefálica ou pela falta de afinidade pelo referido tecido. A presença de leucotoxina foi considerada como infecção pelo fato da contagem de CFU no coração também ter sido positiva. Todavia, considerando que a leucotoxina pode ser encontrada na forma solúvel, não se pode descartar a hipótese de que a infecção seja localizada oralmente e que os seus fatores solúveis como a leucotoxina difundam para os outros órgãos.

Os resultados obtidos poderão contribuir tanto para diagnóstico como para acompanhamento do tratamento de periodontites. E também considerando que os estudos epidemiológicos evidenciaram uma possível relação etiológica entre periodontites e doença arterial periférica (PAD) (MENDEZ *et al.*, 1998, HUNG *et al.*, 2003), com risco maior de desenvolver a doença (CHEN *et al.*, 2007), se torna importante um estudo sistêmico além da investigação local. Neste contexto considera-se importante a pesquisa da leucotoxina pelo fato de poder ser encontrada tanto no microrganismo como na forma solúvel. Em estudos futuros adicionais com introdução *in vivo* de leucotoxina purificada em modelos experimentais poderão contribuir para a melhor compreensão da patogênese de outras afecções não periodontais.

CONCLUSÕES

- Ocorre aumento no nível de IgG anti-leucotoxina no decorrer de infecção experimental de camundongos BALB/c com *A. actinomycetemcomitans*.
- É possível utilizar a ELISA captura para detecção de leucotoxina em tecido infectado.
- Os níveis de leucotoxina são mantidas no período de 15 a 60 dias pós-infecção em camundongos BALB/c infectados com *A. actinomycetemcomitans*.
- Ocorre aumento no nível de imunocomplexo no decorrer da infecção
- Ocorre disseminação de *A. actinomycetemcomitans* ou de leucotoxina do tecido bucal para os tecidos cardíaco e esplênico.

REFERÊNCIAS

- AVILA-CAMPOS ,M.J.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.R.; DAMASCENO, C.A.V.; CISALPINO, E.º Atividade hemolítica de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Rev Microbiol**, v.19, p.262-265, 1988.
- CELLEN, L.M., DECOSTERE, A., DUCATELLE, R., Cytolethal distending toxin generates cell death by inducing a bottleneck in the cell cycle. **Microbiol Res**, v. 161, p.109-120, 2006.
- CHRISTERSSON, L. A., ALBINI, B., ZAMBON, J. J., WIKESJÖ, U. M. E., GENCO, R. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. **J Periodontol**, v. 58, n. 8, p.529-539, 1987.
- CHEN YW, UMEDA M, NAGASAWA T, TAKEUCHI Y, HUANG Y, INOUE Y, IWAI T, IZUMI Y AND ISHIKAWA I. Periodontitis may increase the risk of peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. In press doi:10.1016/j.ejvs.2007.
- GARLET, G.P.; AVILA-CAMPOS, M.J.; MILANEZI, C.M.; FERREIRA, B.R.; SILVA, J.S. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 738–747, 2005.
- GREGORY, R.L.; KIM, D.E.; KINDLE, J. C.; HOBBS, L.C. Immunoglobulin-degrading enzymes in localized juvenile periodontitis. **J. Periodont. Res.**, v.27, p.176-183, 1992.
- GUAZELI-AMIN, V. H. Análise da atividade leucotóxica de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e do efeito neutralizador de anticorpos anti-leucotoxina. Tese (Mestrado) -Universidade Estadual de Londrina, 1998.
- HARASZTHY, V.I.; ZAMBIN, J.J.; TREVISAN, M.; ZEID, M.; GENCO, R.J. Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and others forms of early-onset periodontitis. **J Periodontol**, v.71:, p. 912-922, 2000.
- HUNG HC, WILLET W, MERCHANT A, ROSNER BA, ASCHERIO A, JOSHIPURA K. Oral health and peripheral arterial disease. **Circulation**, v. 107, p. 1152-1157, 2003
- KAMIJI N. H. Nível de leucotoxina em isolados clínicos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* utilizando anticorpos monoclonais e policlonais. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, 2007.
- KAPLAN, J. B.; PERRY, M. B.; MACLEAN, L. L.; FURGANG, D.; WILSON, M. E.; FINE, D.H. Structural and genetic analysis of O-polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. **Infection Immunology**, v.69, p.5375–5384, 2001.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MANGAN, D.F.; TAICHMAN, N.S.; LALLY, E.T.; MWAHL, S.M. Lethal effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human T lymphocytes. **Infect Immun**, v.59, p.3267-3272, 1991.

MARQUES-DA-SILVA, S.H.; COLOMBO, A. L.; BLOTTA, M.H.S.L., LOPES, J.D., TELLES, F.Q., CAMARGO, Z.P. Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. **J Clinical Microbiol**; v.41, p. 3675-3680, 2003.

MENDEZ, M. V.; GARCIA, P.; MENZOIAN, J. O.; VOKONAS, P. S.; LAMORTE, W. & SCOTT, T.,. An association between periodontal disease and peripheral vascular disease. **American Journal of Surgery**, v. 176, p.153-157, 1998.

MIURA CSN, ESTEVÃO D, LOPES JD, ITANO EN. Levels of specific antigen (gp43), specific antibodies, and antigen-antibody complexes in saliva and serum of paracoccidioidomycosis patients. **Med Mycol** 2001; 39 (5): 423-428.

NAKAGAWA R.I. Atividade Leucotóxica de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Sobre a Linhagem Celular P3U1 e Anticorpos Anti-fração de Leucotoxina em Soros de Pacientes com Periodontite Juvenil Localizada. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, 2000.

NAKAGAWA, R. I., GUAZELI-AMIN, V. H., HIDALGO, M. M.. Anti-leukotoxin antibodies against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in serum and saliva samples from patients with localized juvenile periodontitis. **Pesq Odontol Bras.**, v.15, n.1, p.05-11. 2001.

OSHIRO K.K. Obtenção de anticorpos monoclonais a leucotoxina de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Monografia, Curso de Biomedicina da Universidade Estadual de Londrina, 2005.

SHENKER, B.J.; VITALE L.A.; WELHAM, D.A. Immune suppression induced by *A. actinomycetemcomitans*: effects on immunoglobulin production by human B cells. **Infect Immun**, v.58, p.3856-3862, 1990.

SLOTS, J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. In; NISENGARD, R.J. & Newman, M.G **Oral Microbiol Immunol**, Philadelphia, P.A.; Saunders, p.218-227, 1994.

TOWSEND, T.R.; GILLENWATER, J.Y. Urinary tract infection due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J American Med Assoc**, v.210, p.558, 1969.

VAN WINKELHOFF, A.J.; de GROOT, P.; ABBAS, F.; de GRAAF, J. Quantitative aspects of the subgingival distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a patient with localized juvenile periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 21, p. 199-202, 1994.

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

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

ZAMBOM, J.J. Microbiologia de doença periodontal. In: GENCO. R.J.; GOLDMAN, H.M.; COHEN, D.W. **Periodontia Contemporânea**, 2.ed. São Paulo: Santos, p.147-160, 1997.

ANEXO

ANEXO A

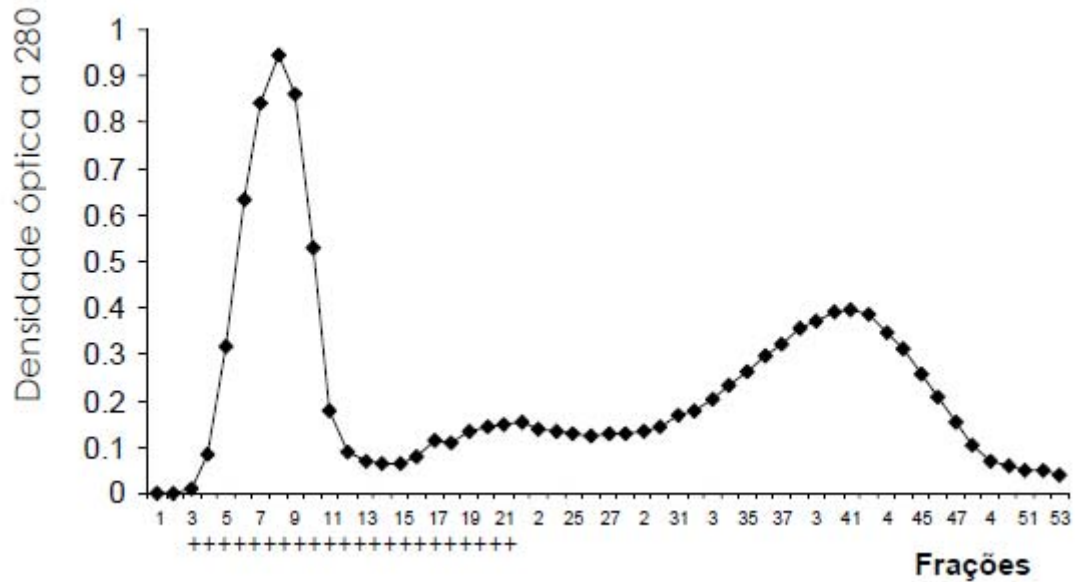


Figura 1 – Obtenção da fração de leucotoxina por cromatografia de extratos sonicados de *A.actinomyetemcomitans* em coluna de *Sephadex* G200.

Amostras de extratos sonicados de *A. actinomyetemcomitans* ATCC 43718 foram aplicadas em coluna de *Sephadex* G200 (2 X 50 cm) e as frações obtidas analisadas em espectrofotômetro a 280 nm e por ELISA utilizando anticorpos policlonais e monoclonais a leucotoxina. O perfil espectrofotométrico foi construído com base nos resultados expressos em densidade óptica (D.O.) a $\lambda = 280$ nm e + indicam as frações reativas por ELISA (frações positivas 3 a 18).

Tabela 1 – Contagem de Unidade Formadora de Colônia.

	15 dias (pós- infecção)	30 dias (pós- infecção)	60 dias (pós- infecção)
Cam. 1	01	01	03
Cam. 2	01	02	02
Cam. 3	01	01	02
Cam. 4	01	02	02
Cam. 5	02	02	02
Cam. 6	02	03	02
Media/Desvio padrão	1,33 ± 0,51	1,83 ± 0,75	2,16 ± 0,98

*Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

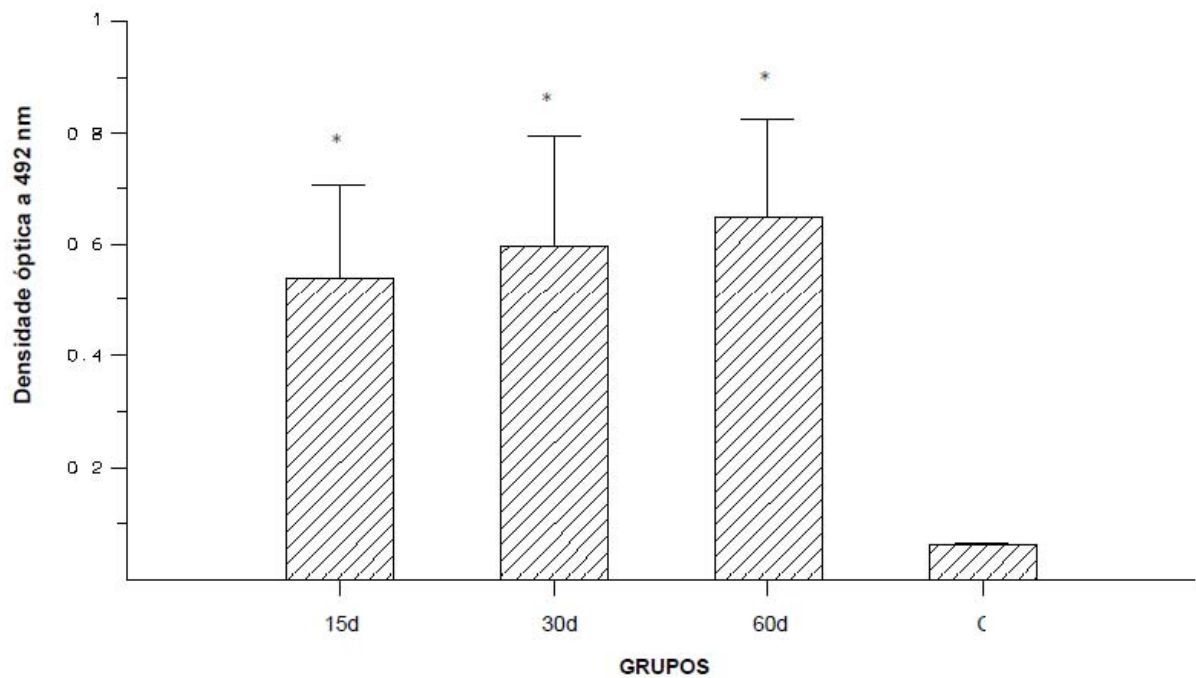


Figura 2 – Nível de IgG anti-leucotoxina plasmática de camundongos obtido por ELISA clássico.

O ELISA foi realizado em placas sensibilizadas com frações de leucotoxina e incubadas com amostras de plasmas de camundongos infectados bucalmente com *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 (15d, 30d e 60d = período de 15, 30 e 60 dias pós-infecção) e camundongos controles não infectados (C), em triplicata. Os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O.) a $\lambda = 492$ nm, considerando * $p < 0.05$ significativa em relação ao grupo controle.

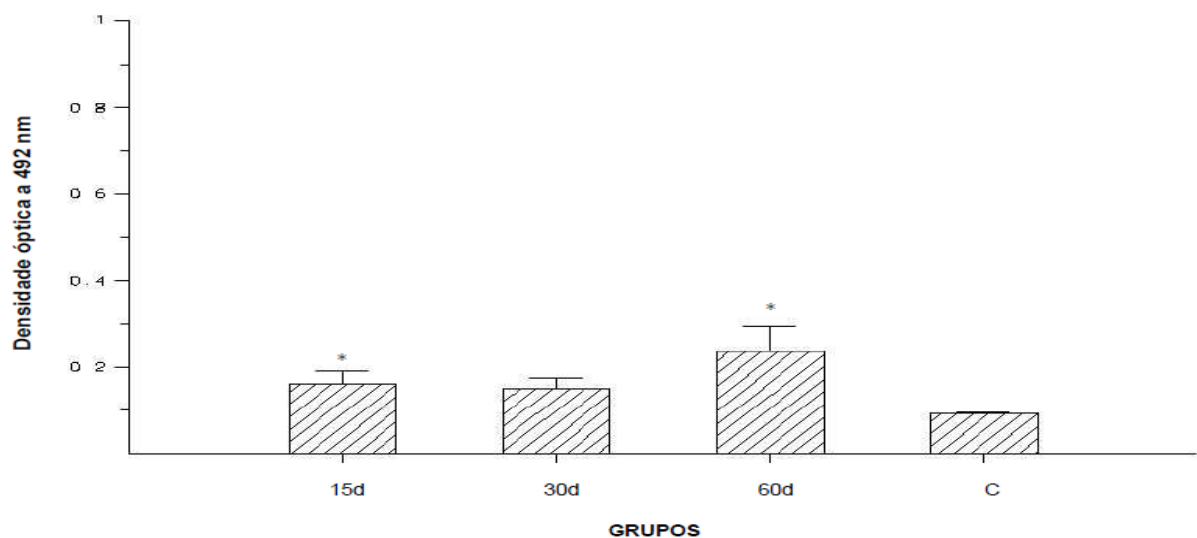


Figura 3 – Nível de imuno complexo IgG-anti-leucotoxina –leucotoxina no plasma de camundongos por ELISA.

Placas de ELISA foram sensibilizadas com IgG de coelho anti-leucotoxina, amostras de plasmas de camundongos infectados bucalmente com *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 (15d, 30d e 60 d = período de 15, 30 e 60 dias pós-infecção) e camundongos controles não infectados (C) diluídas a 1/10 e conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo, em triplicata. Os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O.) a $\lambda = 492$ nm, considerando * $p < 0.05$ significante em relação ao grupo controle.

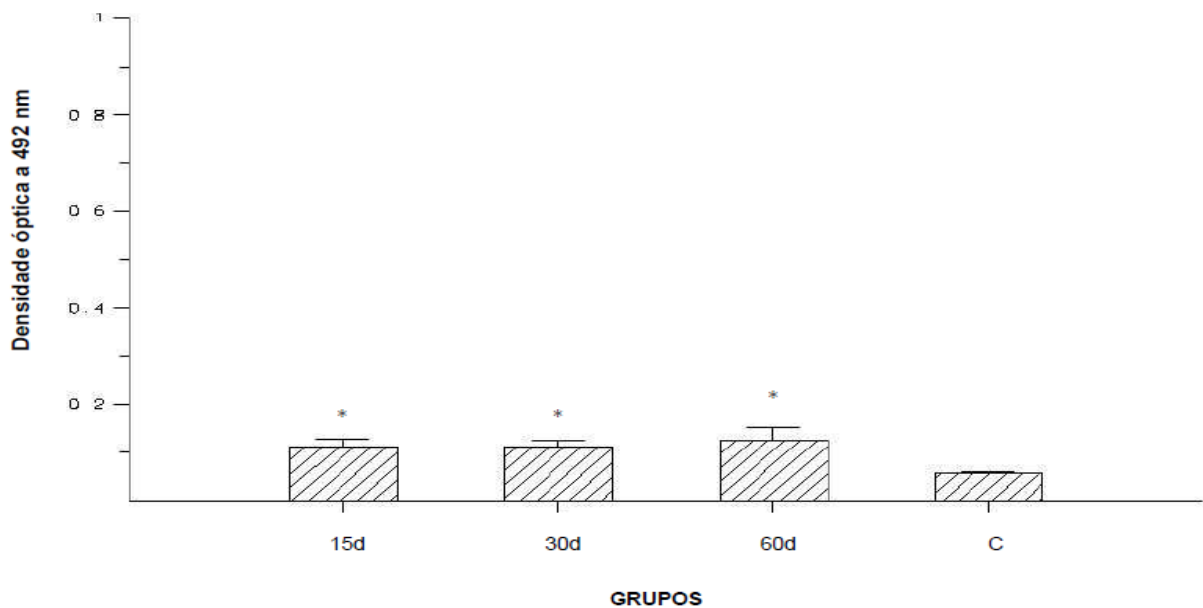


Figura 4 – Nível de leucotoxina no tecido palatino de camundongos por ELISA.

Placas de ELISA foram sensibilizadas com IgG de coelho anti-leucotoxina seguida de amostras de órgãos macerados provenientes de camundongos infectados bucalmente com *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 (15d, 30d e 60 d = período de 15, 30 e 60 dias pós-infecção) e camundongos controles não infectados (C) e IgG monoclonal de camundongo anti-leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans*, em triplicata. Os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O.) a $\lambda = 492$ nm, considerando * $p < 0.05$ significante em relação ao grupo controle.

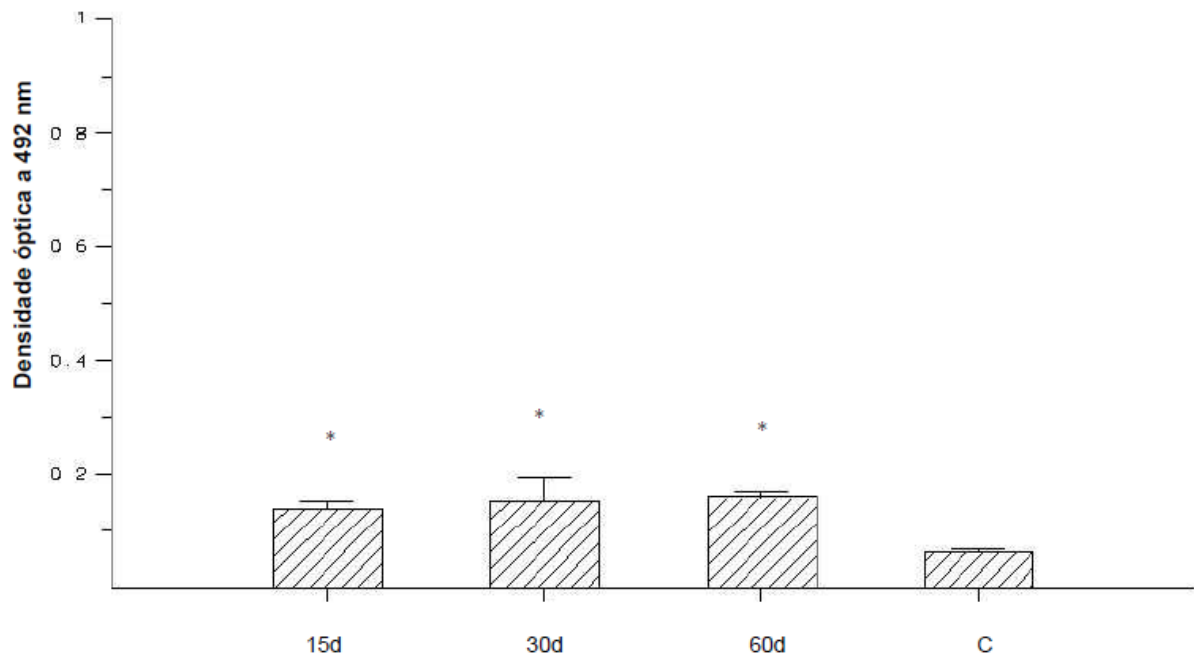


Figura 5 – Nível de leucotoxina em amostra de coração de camundongos por ELISA.

Placas de ELISA foram sensibilizadas com IgG de coelho anti-leucotoxina seguida de amostras de órgãos macerados provenientes de camundongos infectados bucalmente com *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 (15d, 30d e 60 d = período de 15, 30 e 60 dias pós-infecção) e camundongos controles não infectados (C) e IgG monoclonal de camundongo anti-leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans*, em triplicata. Os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O.) a $\lambda = 492$ nm, considerando * $p < 0.05$ significante em relação ao grupo controle.

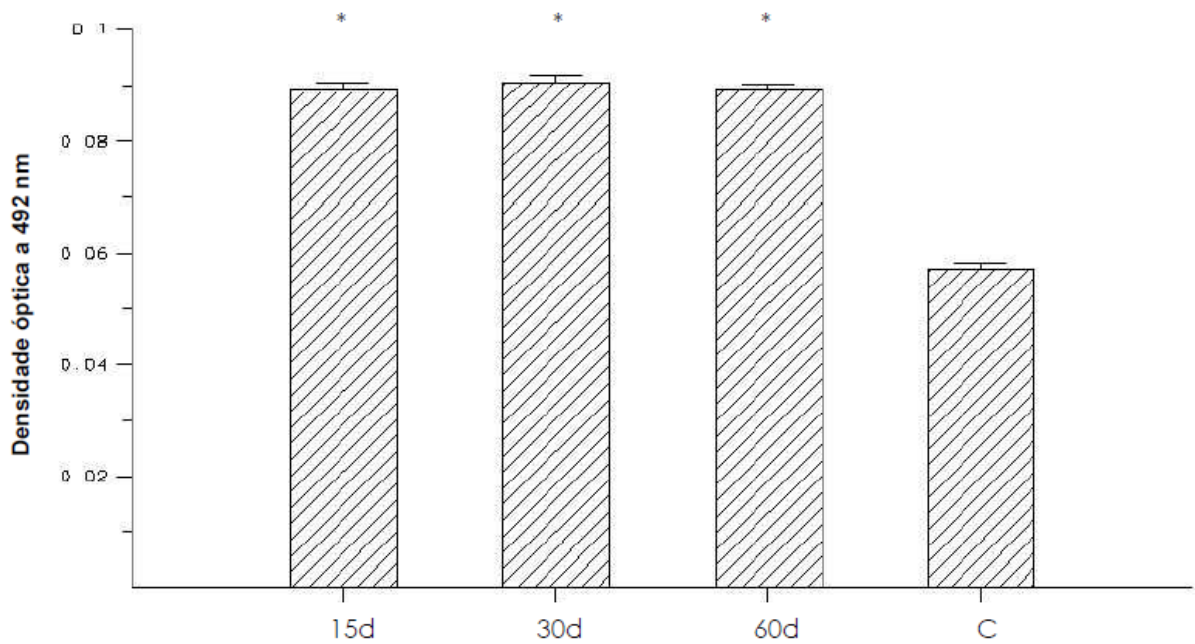


Figura 6 – Nível de Leucotoxina no Baço de Camundongos por ELISA.

Placas de ELISA foram sensibilizadas com IgG de coelho anti-leucotoxina seguida de amostras de órgãos macerados provenientes de camundongos infectados bucalmente com *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 (15d, 30d e 60 d = período de 15, 30 e 60 dias pós-infecção) e camundongos controles não infectados (C) e IgG monoclonal de camundongo anti-leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans*, em triplicata. Os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O.) a $\lambda = 492\text{ nm}$, considerando * $p < 0.05$ significante em relação ao grupo controle.