



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NÁDIA HIZURU KAMIJI

**“NÍVEL DE LEUCOTOXINA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE
Aggregatibacter actinomycetemcomitans UTILIZANDO
ANTICORPOS MONOCLONAIS E POLICLONAIS”**

Londrina
2007

NÁDIA HIZURU KAMIJI

**“NÍVEL DE LEUCOTOXINA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE
Aggregatibacter actinomycetemcomitans UTILIZANDO
ANTICORPOS MONOCLONAIS E POLICLONAIS”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano

Londrina
2007

NÁDIA HIZURU KAMIJI

**“NÍVEL DE LEUCOTOXINA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE
Aggregatibacter actinomycetemcomitans UTILIZANDO
ANTICORPOS MONOCLONAIS E POLICLONAIS”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mirian Marubayashi Hidalgo
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Jacinta Pelayo
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 31 de julho de 2007.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família. Meus pais, Yoshitaka e Quimie Kamiji e meu irmão Valter que são as referências para que eu tenha e busque, sempre, motivação para o meu crescimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre me protege e abençoa com novas oportunidades felizes em cada fase de minha vida.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Eiko Nakagawa Itano pelo seu conhecimento, incentivo e exemplo de dedicação com a pesquisa em que pude crescer profissionalmente. E, pelos conselhos, as risadas e a amizade que foram selados desde os tempos da graduação.

Ao pessoal do NIP-08, como poderei esquecer! Foi uma boa parte da minha vida dividindo a bancada com todos vocês. Dividi alegrias, frustrações e sucessos também que vou levar por toda minha vida. Tenho certeza que aqui conquistei grandes e verdadeiras amizades.

À Mári S. Kaminami e Nilson de Jesus pelo apoio técnico e conhecimento.

À Fernanda A. Nakanishi pelo incentivo, companheirismo durante todo esse trabalho. Pela sua generosidade e amizade acima de tudo.

Aos colegas de laboratório Berenice Tatibana, Juliana Rubira, Alexandre Sasaki, Solange Ramos, Kátia Oshiro, Rosália, Luciene Nagashima, Thiago Massuda, Paula Leonello, Thiago Fujita e Wélter pelo companheirismo e amizade.

Aos meus colegas de pós-graduação Raquel Girardello, Marcelo Tempesta, Leandro Godoy e Alessandra Cristina pelos grandes momentos de alegria, amizade e risadas e, também pelo companheirismo em importantes momentos que nunca esquecerei.

Aos técnicos Ediél e Zui pela colaboração e disponibilidade durante o trabalho. A todos os docentes do Programa de Microbiologia pelos conhecimentos e a toda turma de Mestrado pelas festas pós-seminários.

Aos secretários Alex e Rosilda pela dedicação e prestabilidade.

KAMIJI, Nádia Hizuru. Nível de Leucotoxina em isolados clínicos de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* utilizando anticorpos Monoclonais e Policlonais. 2007. 43f.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

Sanidade e qualidade são requisitos do presente e futuro da produção mundial de alimentos. Perdas de grãos são comuns devido a problemas de produção e condições ambientais, doenças, pragas e procedimentos incorretos na pré e pós-colheita. Contaminantes, resíduos de pesticidas e micotoxinas podem causar problemas de saúde ao homem advindos do consumo de produtos de trigo. Assim, este trabalho teve o objetivo de desenvolver um programa integrado de gestão, para preservação da identidade/ qualidade tecnológica e garantir a inocuidade do trigo, da produção até a armazenagem. Foi realizado na Integrada Cooperativa Agroindustrial, Unidade Regional do Município de Assai-PR, durante a safra de 2005. Para tanto, as Boas Práticas Agrícolas (BPA), Boas Práticas de Armazenagem (BPAr) e Manejo Integrado de Pragas em Grãos Armazenados (MIPgrãos), já empregadas pela Cooperativa, foram revistos e monitorados e foi implementado o programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). A metodologia do APPCC foi desenvolvida após um diagnóstico dos processos de cultivo, colheita, transporte, secagem e armazenagem. Foram feitas análises de contaminantes (pragas e micotoxinas) em grãos coletados periodicamente, na recepção e durante a estocagem. Para verificação da qualidade tecnológica realizaram-se análises reológicas, de glúten e de cor em farinhas obtidas dos grãos. Foi detectado um Ponto Crítico de Controle (PCC), na etapa de recepção dos grãos, referente ao perigo de micotoxinas e também de avaliação tecnológica. Os resultados das análises realizadas foram um indicativo de que o sistema, APPCC e segregação de grãos com suspeita de dano tecnológico causado pela chuva foram adequados para garantir a inocuidade e preservar a identidade do trigo produzido.

Palavras-chave: *A. actinomycetemcomitans*. Boca – microbiologia. Teste imunoenzimático. Periodonite.

KAMIJI, Nádia Hizuru. Nível de Leucotoxina em isolados clínicos de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* utilizando anticorpos Monoclonais e Policlonais. 2007. 43f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

Aggregatibacter actinomycetemcomitans bacillus (*A. actinomycetemcomitans*) is the major pathogen in human periodontitis. The routine method of *A. actinomycetemcomitans* isolation for diagnosis, accompanied by therapy and of periodontitis treatment monitoring used to control reinfection, requires several days of anaerobic culture. The objectives of the present work were to produce monoclonal and polyclonal antibodies, standardize a methodology for the dosage level of *A. actinomycetemcomitans* leukotoxin and determine the levels of soluble leukotoxin in clinical isolates. Monoclonal antibodies were obtained by fusing the splenic cells of immune BALB/C mice with P3U1 cells and polyclonal antibodies for rabbit immunization; both species were immunized with a leukotoxin fraction partially purified by chromatographic processes. After standardization of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA capture technique), samples of culture supernatants from clinical isolates of patients presenting aggressive periodontitis (AP) and necrotizing ulcerative periodontitis/AIDS (NUP/AIDS) were analyzed. The results obtained demonstrated recognition of the same fractions by polyclonal and monoclonal antibodies and the results of ELISA capture standardization demonstrated the possibility of determining leukotoxin dosages at concentrations between 25 and 100mg/ml. Analysis of the clinical isolate concentrations for ELISA capture at OD 492nm demonstrated higher levels of leukotoxin in isolated culture supernatants from the AP group (0.190375 ± 0.0574) in relation to the NUP/AIDS group (0.110455 ± 0.0430), ($p < 0,05$). In conclusion, the results obtained showed that it is possible to determine the leukotoxin dosage for use with monoclonal and polyclonal antibodies and that *A. actinomycetemcomitans* isolated from patients presenting AP liberates greater quantities of leukotoxin in culture supernatants than NUP/AIDS patients. This work is pioneering regarding leukotoxin dosage for ELISA and could contribute to future epidemiological studies concerning leukotoxin production in *A. actinomycetemcomitans*. Moreover, after further study, this method could be important as a fast alternative diagnostic tool and for treatment monitoring.

Keywords: *A. actinomycetemcomitans*. Mouth – microbiology. ELISA. Periodonite.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 –Fracionamento de leucotoxina em coluna <i>Sephadex</i> G-200, reatividade das frações com anticorpo monoclonal e policlonal.....	37
Figura 2 –Análise das frações obtidos da coluna de DEAE	38
Figura 3 – <i>Western blotting</i>	39
Figura 4 –Resultado da padronização de ELISA captura para dosagem do nível de leucotoxina	40
Figura 5 –Análise do nível de leucotoxina em sobrenadantes de isolados de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	43
Tabela 1 –Análise do nível de leucotoxina em sobrenadantes de isolados de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	41

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Centígrados
µg	Micrograma
µL	Microlitro
ng	Nanograma
cm	Centímetro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanômetros
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
DAB	Diaminobenzidina
ELISA	Ensaio imunoenzimático
H₂O₂	Água oxigenada
IgG	Imunoglobulina G
kDa	Quilodalton
M	Molaridade
mV	Milivolts
NaOH	Hidróxido de sódio
OPD	Ortofenilendiamino
PA	Periodontite agressiva
PBS	Tampão salina fosfato
PC	Periodontite crônica
PEG	Polietilenoglicol
RTX	<i>Repeats toxins</i> (toxina com repetições)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 O BACILO <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (Aa)	11
1.2 LEUCOTOXINA DE <i>A. actinomycetemcomitans</i> : SECREÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL.	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
REFERÊNCIAS	16
ARTIGO – “NÍVEL DE LEUCOTOXINA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> UTILIZANDO ANTICORPOS MONOCLONAIS E POLICLONAIS”	20
RESUMO	21
ABSTRACT	22
INTRODUÇÃO.....	23
MATERIAL E MÉTODOS	24
<i>Cultivo de A. actinomycetemcomitans</i>	24
<i>Obtenção de extrato sonicado e de sobrenadante de cultura contendo leucotoxina</i>	24
<i>Cromatografia em coluna de Sephadex G200</i>	25
<i>Obtenção dos anticorpos monoclonais anti-leucotoxina A. actinomycetemcomitans</i>	25
<i>Obtenção dos anticorpos policlonais anti-leucotoxina A. actinomycetemcomitans</i>	25
<i>Refração da leucotoxina de A. actinomycetemcomitans pela coluna de afinidade iônica DEAE</i>	26
<i>Análise de reatividade dos anticorpos monoclonais e policlonais anti-leucotoxina de A. actinomycetemcomitans às frações de cromatografia</i>	26
<i>Análise dos anticorpos monoclonais por Western blotting</i>	26
<i>Padronização da dosagem do nível de leucotoxina</i>	27
<i>ELISA captura para análise do nível de leucotoxina em amostras de sobrenadante de cultivo de isolados clínicos de A. actinomycetemcomitans</i>	27
<i>Análise estatística</i>	28
RESULTADOS	29

<i>Análise de reatividade dos anticorpos monoclonais e policlonais anti-leucotoxina de A. actinomycetemcomitans às frações de cromatografia</i>	29
<i>Análise de anticorpos monoclonais por Western-blotting</i>	29
<i>Padronização de ELISA captura para dosagem de leucotoxina</i>	29
<i>Análise do nível de leucotoxina em sobrenadantes de isolados de A. actinomycetemcomitans</i>	29
DISCUSSÃO	31
CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1 INTRODUÇÃO

1.1 O BACILO *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa)

Actinobacillus actinomycetemcomitans recentemente re-classificado como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) (NØRSKOV-LAURITSEN; KILIAN, 2006) tem sido focalizado em vários trabalhos de pesquisa como sendo o principal agente etiológico da periodontite juvenil localizada (TSAI *et al.*, 1981; SUZUKI; PARK; FALKER, 1984; SLOTS; REINOLDS; GENCO, 1980), atualmente denominada de periodontite agressiva (ARMITAGE, 1999), e da periodontite crônica quando associado a outros microorganismos (SLOTS, 1994; CHAVES *et al.*, 2000; JARAMILLO *et al.*, 2005).

Apesar da sua implicação na odontologia, *A. actinomycetemcomitans* não é exclusivo de patologias bucais, podendo também ser isolado extra-oralmente em casos de endocardites, lesões actinomicóticas, abscesso de glândula tireóide, infecções do trato urinário e osteomielite vertebral (SLOTS, 1994; ZAMBON, 1997).

Os achados microbiológicos de *A. actinomycetemcomitans* em doenças sistêmicas, podem ser relacionados com a ocorrência clínica da doença periodontal. Em pacientes com periodontite crônica, os vários episódios de bacteremia, possibilitam a migração do *A. actinomycetemcomitans* para as placas de ateroma (PADILLA *et al.*, 2006).

A. actinomycetemcomitans é um cocobacilo não-móvel, Gram-negativo, microaerófilo, fermentativo e produtor de catalase (ZAMBON, 1985). Baseado nos diferentes carboidratos do lipopolissacarídeo de sua membrana, o referido cocobacilo pode ser dividido em 6 sorotipos (a, b, c, d, e e f). Dentre esses, os sorotipos a, b e c são mais frequentemente isolados da cavidade bucal (SAARELLA *et al.*, 1992) com maior prevalência do sorotipo b em amostras de pacientes com periodontites agressiva e crônica e do sorotipo c em indivíduos saudáveis (YAUNG *et al.*, 2005). Zambon, Slots e Genco (1983) verificaram que cada paciente apresentava somente um sorotipo de *A. actinomycetemcomitans* e que indivíduos saudáveis apresentavam sorotipo a e b em proporções parecidas.

A morfologia e/ou genótipo de *A. actinomycetemcomitans* varia entre duas formas: a aderente, com presença de fimbrias o que é característico de cepas recém isoladas *in vitro*; e a forma não-aderente, obtida após vários repiques também *in vitro*. A perda

irreversível de fímbrias 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 produz vários fatores biologicamente ativos que servem como fatores de virulência interferindo no mecanismo de defesa do hospedeiro como a indução da imunossupressão inibindo várias funções críticas das células linfóides como a blastogênese, a produção de anticorpos e a síntese de citocinas ou mesmo por meio da ativação de fatores supressores (SHENKER; TSAI; TAICHMAN, 1982). Recentemente, tem sido descrita a presença da toxina citoletal (Cdt), com propriedades imunossupressivas capazes de interferir no ciclo celular das células T humanas (CELLEN; DECOSTERE; DUCATELLE, 2006; SHENKER; DEMUTH; ZEKAVAT, 2006). Análise por PCR mostrou que cepas de *A. actinomycetemcomitans* com genótipo Cdt são isoladas com maior frequência de pacientes com a forma agressiva do que com a forma crônica da doença periodontal (TAN; SONG; ONG, 2002).

Além disso, o bacilo apresenta enzimas proteolíticas capazes de clivar *in vitro* as imunoglobulinas G (GREGORY *et al.*, 1992; NAKANISHI *et al.*, 2006), A e M (GREGORY *et al.*, 1992).

A imunoglobulina G (IgG) é um mediador importante e efetivo da defesa imune. É capaz de ativar o sistema complemento e mediar a opsonização por ter afinidade a receptores Fc nas células fagocíticas. É a classe mais abundante presente no soro, constituindo aproximadamente 80% do total das imunoglobulinas séricas (KUBY, 2000). A clivagem de IgG pode dar uma vantagem aos patógenos na progressão da doença (GREGORY *et al.*, 1992).

Ainda, Rams, Listgarten e Slots (2006) verificaram níveis superiores de IgG anti-*A. actinomycetemcomitans* em pacientes com doença periodontal controlada em relação aos pacientes com a doença na sua fase agressiva.

A. actinomycetemcomitans apresenta, ainda, capacidade para mediar a reabsorção óssea, inibir o crescimento e a proliferação dos fibroblastos, das células endoteliais e epiteliais, interferindo em suas atividades, podendo levar à destruição de tecido conjuntivo subgingival e prejudicando a neoformação do colágeno (SHENKER; TSAI; TAICHMAN, 1982). Pode atuar como ativadores policlonais de células B (SLOTS; REINOLDS; GENCO, 1980) e também apresenta atividades hemolítica e proteolítica (AVILA-CAMPOS *et al.*, 1988).

Dentre os diversos fatores de virulência apresentados, *A. actinomycetemcomitans* possui também a capacidade de invasão de células do epitélio bucal, do tipo microfilamento-dependente (MEYER; SREENIVASAN; FIVES-TAYLOR, 1991). Christersson e colaboradores, em 1987, observaram que cepas com fenótipo aderente invadem mais que aquelas não-aderentes em ensaios *in vitro* e que 80% de tecidos provenientes de pacientes apresentavam infiltrado de *A. actinomycetemcomitans*.

A capacidade de adesão de *A. actinomycetemcomitans* às células epiteliais bucais, além de estar relacionado com a presença de fímbrias parece depender da quantidade de ferro ligado à lactoferrina da saliva (FINE; FURGANG; BEYDOUIN, 2002). A interação de lipopolissacarídeos de membrana de *A. actinomycetemcomitans* com hemoglobina humana foi demonstrado por Grenier, Leduc e Mayrand (1997), consistindo em uma das fontes de aquisição de ferro necessário para o metabolismo bacteriano.

Atualmente, um dos fatores de virulência de *A. actinomycetemcomitans* mais investigado é a leucotoxina que é uma proteína hidrossolúvel com peso molecular de aproximadamente 116kDa, pertencente à família RTX. Sua molécula pode ser dividida em quatro porções: N-terminal, central, seqüência de repetições e a porção C-terminal (BOEHM; WELCH; SNYDER, 1990).

As toxinas da família RTX conservam uma região N-terminal hidrofóbica, responsável pela formação de poros nas células alvo (NARAYANAN *et al.*, 2001), e uma porção C-terminal rica em glicina. Essas repetições de glicina são cálcio-dependente, responsáveis pela atividade tóxica (BOEHM; WELCH; SNYDER, 1990).

O gene *lktA* da leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans*, possui cerca de 40% a 50% de homologia com as exotoxinas de *Escherichia coli* e *Mannheimia haemolytica*. É flanqueada por outros três genes, *lktC*, *lktB* e *lktD*, sendo o gene *lktC* responsável pela ativação, e os genes *lktB* e *lktD* pela exportação da toxina (SPITZNAGEL; KRAIG; KOLODRUBETZ, 1991).

A leucotoxina é encontrada associada à célula bacteriana, sob forma solúvel no sobrenadante de cultivo (KACHLANY, FINE & FIGURSKI, 2000), ou ainda em vesículas membranosas (KATO; KOWASHI; DEMUTH, 2002).

1.2 LEUCOTOXINA de *A. actinomycetemcomitans*: SECREÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Estudos de Ohta e colaboradores (1993) demonstraram que *A. actinomycetemcomitans* mantinha a atividade leucotóxica somente ligada às células, enquanto que as bactérias da família RTX secretavam a leucotoxina. Posteriormente, Kachlany, Fine e Figurski (2000) demonstraram que, em cultivos de cepas não aderentes (JP2) e aderentes (Y4) de *A. actinomycetemcomitans*, a leucotoxina é encontrada em grande quantidade no sobrenadante de cultivo e, que no caso dessa última cepa pequena quantidade ainda permanece ligada à célula. De acordo com Ohta e colaboradores (1993) a leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* pode ser encontrada associada ao ácido nucléico ou à vesículas membranosas que são liberadas ao meio de cultivo (NOWOTNY *et al.*, 1982). Os componentes dessas vesículas membranosas são ricos em leucotoxina (KATO; KOWASHI; DEMUTH, 2002), ainda que a endotoxina e algum fator de reabsorção também possam estar presentes de acordo com Nowotny e colaboradores (1982).

In vitro, *A. actinomycetemcomitans* quando incubado com soro humano ou com albumina pura em concentração-dependente leva à rápida liberação da leucotoxina e apenas uma pequena quantidade permanece associada a vesículas membranosas (JOHANSON *et al.*, 2003). A quantidade de leucotoxina liberada depende de a cepa apresentar o genótipo de alta ou baixa produção (CORTELLI *et al.*, 2005).

A leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* possui uma ação altamente específica para leucócitos periféricos humanos e de macacos (TAICHMAN *et al.*, 1984) e também para leucócitos gengivais (TAICHMAN; WILTON, 1981), ao contrário, da hemolisina de *Escherichia coli* e da leucotoxina de *Pasteurella haemolytica* com especificidade variada embora pertencente à essa família. A leucotoxina atua, portanto, lisando neutrófilos e macrófagos e comprometendo, dessa forma, a fagocitose ou mesmo a ação citotóxica dependente de anticorpos (KUBY *et al.*, 2000, JOHANSSON *et al.*, 2000).

Segundo Mangan e colaboradores (2000), a leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* em altas concentrações elimina os linfócitos T por dois mecanismos conhecidos: a necrose, onde a membrana celular é danificada; e/ou pelo mecanismo de programação de morte celular, na qual a membrana plasmática continua intacta.

Essa capacidade de induzir a morte celular dos linfócitos T por duas vias é atípica, quando comparado a outras citolisinas bacterianas e mamíferas. A imunossupressão local do hospedeiro, provocado pela deficiência de células T, pode ser a explicação para o desenvolvimento de doenças periodontais crônicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar e determinar o nível de leucotoxina em isolados clínicos de *A. actinomycetemcomitans* utilizando anticorpos monoclonais e policlonais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Purificar parcialmente leucotoxina de *Aa*.

2.2.2. Obter anticorpos monoclonais e policlonais a leucotoxina de *Aa*.

2.2.3. Padronizar metodologia de ELISA captura utilizando anticorpos monoclonais e policlonais a leucotoxina de *Aa*.

2.2.4. Determinar o nível de leucotoxina em isolados clínicos de *Aa*.

REFERÊNCIAS

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

AVILA-CAMPOS, M.J.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.AR.; DAMASCENO, C.AV.; CISALPINO, E.O. Atividade hemolítica de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Rev. Microbiol.**, v.19, n.3, p.262-265, 1988.

BOEHM, D.F.; WELCH, R.A.; SNYDER, I.S. Calcium is required for binding of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) to erythrocyte membranes. **Infect. Immun.**, v. 58, n.6, p.1951-1958, 1990.

CELLEN, L.M.; DECOSTERE, A.; DUCATELLE, R. Cytotoxic distending toxin generates cell death by inducing a bottleneck in the cell cycle. **Microbiol. Res.**, v.161, n.1, p.109-120, 2006.

CHAVES, E.S; JEFFCOAT, M.K; RYERSON, C.C; SNYDER, B. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. **J. Clin. Periodontol.**, v.27, n.12, p. 897–903, 2000.

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.

CORTELLI, JR; CORTELLI, SC; JORDAN, S; HARASZTHY, V.I; ZAMBON, J.J. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, n.8, p.860–866, 2005.

FINE, D.H.; FURGANG, D.; SCHREINER, H.C.; GONCHAROFF, P.; CHARLESWORTH, J.; HAZWAN, G.; FITZGERALD-BOCARSLY, P.; FIGURSKI, D.H. Phenotypic variation in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* during laboratory growth: implications for virulence. **Microbiol.**, v. 145, Pt 6, p.1335-1347, 1999.

FINE, D.H.; FURGANG, D.; BEYDOUIN, F. Lactoferrin iron levels are reduced in saliva of patients with localized Aggressive Periodontitis. **Periodontol.**, v.73, n. 6, p.624-630, 2002.

GREGORY, R.L.; KIM, D.E.; KINDLE, J.C.; HOBBS, L.C. Immunoglobulin-degrading enzymes in localized juvenile periodontitis. **J. Periodontal Res.**, v. 27, n.3, p.176-183, 1992.

GRENIER, D.; LEDUC, A.; MAYRAND, D. Interaction between *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharides and human hemoglobin. **FEMS Microbiology Letters.**, v. 151, n.1, p.77-81, 1997.

JARAMILLO A.; ARCE, R.M.; HERRERA, D.; BETANCOURTH, M.; BOTERO, J.E.; CONTRERAS, A. Clinical and microbiological characterization of periodontal abscesses. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, n.12, p.1213–1218, 2005.

JOHANSSON, A.; CLAEISSON, R.; HANSTROM, L.; SANDSTROM, G.; KALFAS, S. Polymorphonuclear leukocyte degranulation induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Periodontal. Res.**, v.35, n.2, p.85-92, 2000.

JOHANSSON, A.; CLAEISSON, R.; HANSTROM, L.; KALFAS, S. Serum-mediated release of leukotoxin from the cell surface of the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Eur. J. Oral. Sci.**, v.111, n.3, p.209–215, 2003.

KACHLANY, S.C; FINE, D.H.; FIGURSKI, D.H. Secretion of RTX leukotoxin by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, v.68, n.11, p.6094-6100, 2000.

KATO, S.; KOWASHI, Y.; DEMUTH, D.R. Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. **Microb. Pathogen.**, v. 32, n.1, p.1-13, 2002.

KUBY, J. **Immunology**. 3ed. New York, W.H.Freeman 2000xp.

MEYER, D.H.; SREENIVASAN, P.K.; FIVES-TAYLOR, P.M. Evidence for invasion of a human oral cell line by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, v.59, n.8, p.2719-2726, 1991.

MANGAN, D.F.; TAICHMAN, N.S.; LALLY, E. T.; WAHL, S.M. Lethal effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human T lymphocytes. **Infect. Immun.**, v.59, n. 9, p.3267-3272, 1991.

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

NARAYANAN, S.K.; KAGARAJA, T.G.; CHENGAPPA, M.M.; STEWART, G.C. Leukotoxin of gram-negative bacteria. **Vet. Microbiol.**, v.84, n.4, p.337-356, 2002.

NØRSKOV-LAURITSEN, N.; KILLIAN, 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. **Syst. Evol. Microbiol.**, v.56, Pt. 9, p.2135-2146, 2006.

NOWOTNY, A.; BEHLING, U.H.; HAMMOND, B.; LAI, C-H.; LISTGARTEN, M.; PHAM, P.H.; SANAVI, F. Release of toxic microvisicles by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, v.37, n.1, p.151-154, 1982.

OHTA, H.; HARA, H.; FUKUI, K.; KURIHARA, H.; MURAYAMA, Y.; KATO, K. Association of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin with nucleic acids on the bacterial cell surface. **Infect. Immun.**, v.61, n.11, p.4878-4884, 1993.

PADILLA, C.; LOBOS, O.; HUBERT, E.; GONZÁLEZ, C.; MATUS, S.; PEREIRA, M.; HASBUN, S.; DESCOUVIERES C. Periodontal pathogens in atheromatous plaques isolated from patients with chronic periodontitis. **J. Periodontal. Res.**, v.41, n.4, p.350-353, 2006.
RAMS, T.E.; LISTGARTEN, M.A.; SLOTS, J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas ginigvalis* subgingival presence, species-specific serum immunoglobulin G antibody levels, and periodontitis disease recurrence. **J. Periodontal. Res.**, v.41, n.3, p.228-224, 2006.

SAARELA, M. H.; DOGAN, B.; ALALUUSUA, S.; ASIKAINEN, S. Persistence of oral colonization by the same *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain(s). **J. Periodontol.**, v. 70, n.5, p.504-509, 1999.

SHENKER, B.J.; TSAI, C.C.; TAICHMAN, N.S. Suppression of lymphocyte responses by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Periodontal. Res.**, v.17, n.5, p.462-465, 1982.

SHENKER, J. B.; DEMUTH, R. D.; ZEKAVAT, A. Exposure of lymphocytes to high doses of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin induces rapid onset of apoptosis-mediated DNA fragmentation. **Infect. Immun.**, v.74, n.4, p.2080-2092, 2006.

SLOTS, J.; REINOLDS, H.S.; GENCO, R.J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. **Infect. Immun.**, v.29, n.3, p.1013-1020, 1980.

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

SPITZNAGEL, J.; JR, KRAIG, E.; KOLODRUBETZ, D.. Regulation of leukotoxin in leukotoxic and nonleukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, v.59, n.4, p.1394–1401, 1991.

SUZUKI, J.B.; PARK, S.K.; FALKER, W.A.. Immunologic profile of juvenile periodontitis. I. Lymphocyte blastogenesis and the autologous mixed lymphocyte response. **J. Periodontol.**, v.55, n.8, p.453-460, 1984.

TAICHMAN, N.S.; WILTON, J.M.A.. Leukotoxicity of an extract from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* for human gingival polymorphonuclear leukocytes. **Inflammation**, v.5, n.1, p.1-12, 1981.

TAICHMAN N. S.; SHENKER B. J.; TSAI C.-C., GLICKMAN L. T., BAEHNI P. C., STEVENS R., HAMMOND B. F. Cytopathic effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* on monkey blood leukocytes. **J. Perio. Res.**, v.19, n.2, p.133–145, 1984.

TAN, K.S.; SONG K-P; ONG, G.. Cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Occurrence and association with periodontal disease. **J. Periodontal Res.**, v. 37, n.4, p.268–272, 2002.

TSAI, C.C.; McARTHUR, W.P.; BAEHNI, P.C.; ENVIAN, C.; GENCO, R.J.; TAICHMAN, N.S. Serum neutralizing activity against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin in juvenile periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v.8, n.4, p.338-348, 1981.

ZAMBON, J. J.; SLOTS, J.; GENCO, R.J. Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. **Infect Immun.**, v.41, n.1, p.19-27, 1983.

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

ZAMBON, 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.

YAUNG, H-W.; HUANG, Y-F.; CHAN, Y.; CHOU, M-Y. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. **Eur. J. Oral Sci.**, v.113, n.1, p.28-33, 2005.

“NÍVEL DE LEUCOTOXINA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* UTILIZANDO ANTICORPOS MONOCLONAIS E POLICLONAIS”

Kamiji, N.H.^{1,4}, Nakanishi, F.A.^{1,4}, Oshiro, K.K.^{1,4}, Kaminami M.S.^{2,4}, Avila-Campos M.J.³, Itano, E. N.⁴

¹ Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, PR, Brasil.

² Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, PR, Brasil.

³ Laboratório de Anaerobiose, Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

⁴ Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, PR, Brasil.

*Correspondência para autor: Eiko Nakagawa Itano. Departamento de Ciências Patológicas, CCB. Universidade Estadual de Londrina. Campus Universitário. 86051-970, Londrina, PR, Brasil. E-mail: itanoeiko@hotmail.com; Fax: 5(043) 3371-4267.

RESUMO

Aggregatibacter actinomycetemcomitans é um dos principais agentes etiológicos da periodontite humana. O método rotineiro de isolamento de *A. actinomycetemcomitans* utilizado para diagnóstico, acompanhamento e monitoramento do tratamento de periodontite de modo a controlar a re-infecção, requer vários dias de cultura em anaerobiose. O objetivo do presente trabalho foi produzir anticorpos monoclonais e policlonais e padronizar metodologia para a dosagem de nível de leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* e adicionalmente realizar a análise de nível de leucotoxina solúvel em isolados clínicos. Os anticorpos monoclonais foram obtidos por fusão de células esplênicas de camundongos BALB/C imunes com as células P3U1 e os anticorpos policlonais por imunização de coelho, sendo ambas as espécies imunizadas com a fração de leucotoxina parcialmente purificada por processos cromatográficos. Após a padronização de ensaio imunoenzimático de captura (ELISA captura) foram analisadas as amostras de sobrenadantes de cultivo de isolados clínicos provenientes de pacientes com periodontite agressiva (PA) e periodontite ulcerativa necrosante/SIDA (PUN/SIDA). Os resultados obtidos demonstraram reconhecimento das mesmas frações pelos anticorpos monoclonais e policlonais e, os resultados de padronização de ELISA captura, demonstraram a possibilidade de se dosar leucotoxina nas concentrações entre 25 a 100µg/mL. Os resultados de análise de isolados clínicos por ELISA captura em D.O. a 492nm demonstraram nível elevado de leucotoxina em sobrenadantes de cultivo do isolados provenientes do grupo PA ($0,190375 \pm 0,0574$) em relação ao grupo PUN/SIDA ($0,110455 \pm 0,0430$), ($p < 0,05$). Pelos resultados obtidos pode-se concluir que é possível dosar o nível de leucotoxina pela utilização de anticorpos monoclonais e policlonais e, que os isolados de *A. actinomycetemcomitans* provenientes de pacientes com PA liberam mais leucotoxina em sobrenadante de cultivo que os provenientes de PUN/SIDA. Este trabalho é pioneiro na dosagem de leucotoxina por ELISA e pode contribuir para um futuro estudo de investigação epidemiológica de *A. actinomycetemcomitans* produtor de leucotoxina. Após estudos adicionais pode ser também importante metodologia alternativa para o rápido diagnóstico e monitoramento de tratamento.

Palavras-chave: Periodontite agressiva. Periodontite ulcerativa necrosante. SIDA. ELISA.

ABSTRACT

Aggregatibacter actinomycetemcomitans bacillus (*A. actinomycetemcomitans*) is the major pathogen in human periodontitis. The routine method of *A. actinomycetemcomitans* isolation for diagnosis, accompanied by therapy and of periodontitis treatment monitoring used to control reinfection, requires several days of anaerobic culture. The objectives of the present work were to produce monoclonal and polyclonal antibodies, standardize a methodology for the dosage level of *A. actinomycetemcomitans* leukotoxin and determine the levels of soluble leukotoxin in clinical isolates. Monoclonal antibodies were obtained by fusing the splenic cells of immune BALB/C mice with P3U1 cells and polyclonal antibodies for rabbit immunization; both species were immunized with a leukotoxin fraction partially purified by chromatographic processes. After standardization of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA capture technique), samples of culture supernatants from clinical isolates of patients presenting aggressive periodontitis (AP) and necrotizing ulcerative periodontitis/AIDS (NUP/AIDS) were analyzed. The results obtained demonstrated recognition of the same fractions by polyclonal and monoclonal antibodies and the results of ELISA capture standardization demonstrated the possibility of determining leukotoxin dosages at concentrations between 25 and 100 μ g/ml. Analysis of the clinical isolate concentrations for ELISA capture at OD 492nm demonstrated higher levels of leukotoxin in isolated culture supernatants from the AP group (0.190375 ± 0.0574) in relation to the NUP/AIDS group (0.110455 ± 0.0430), ($p < 0,05$). In conclusion, the results obtained showed that it is possible to determine the leukotoxin dosage for use with monoclonal and polyclonal antibodies and that *A. actinomycetemcomitans* isolated from patients presenting AP liberates greater quantities of leukotoxin in culture supernatants than NUP/AIDS patients. This work is pioneering regarding leukotoxin dosage for ELISA and could contribute to future epidemiological studies concerning leukotoxin production in *A. actinomycetemcomitans*. Moreover, after further study, this method could be important as a fast alternative diagnostic tool and for treatment monitoring.

Keywords: Aggressive periodontitis. Necrotizing Ulcerative Periodontitis. AIDS. ELISA.

INTRODUÇÃO

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (*A. actinomycetemcomitans*) é um cocobacilo, Gram-negativo, fermentativo, produtor de catalase (ZAMBON *et al.*, 1985). É considerado um dos principais agentes etiológicos por ser mais frequentemente isolado de casos de doença periodontal agressiva e da periodontite crônica onde é encontrado associado à outros microorganismos (SLOTS, 1994; CHAVES *et al.*, 2000; JARAMILLO *et al.*, 2005).

A colonização de *A. actinomycetemcomitans* não é exclusiva de patologias bucais, mas, também de doenças sistêmicas como abscessos, lesões actinomicóticas, abscesso de glândula tireóide, infecções do trato urinário e osteomielite vertebral (SLOTS *et al.*, 1994; ZAMBON, 1997). Trabalhos demonstraram que o mesmo *A. actinomycetemcomitans* pode participar da doença periodontal e migrar desse nicho inicial para uma lesão sistêmica (PADILLA *et al.*, 2006).

A. actinomycetemcomitans produz vários fatores biologicamente ativos que servem como fatores de virulência interferindo no mecanismo de defesa do hospedeiro como a indução da imunossupressão de várias funções críticas das células linfóides como a blastogênese, a produção de anticorpos e a síntese de citocinas, ou mesmo por meio da ativação de fatores supressores (SHENKER *et al.*, 1982). Dentre estes fatores pode-se destacar a leucotoxina, uma proteína hidrossolúvel de aproximadamente 115-150kDa que pode ser encontrado associado à célula bacteriana em vesículas membranosas (KATO *et al.*, 2002) ou sob forma solúvel como encontrado em sobrenadante de meio de cultivo (KACHLANY *et al.*, 2000).

A leucotoxina atua sobre os monócitos (TAICHMAN *et al.*, 1981) e em altas concentrações elimina os linfócitos T por dois mecanismos conhecidos: a necrose, onde a membrana celular é danificada; e/ou pelo mecanismo de programação de morte celular, na qual a membrana plasmática continua intacta, segundo Mangan e colaboradores (1991). Assim, se torna importante o seu estudo sob o ponto de vista de patogenicidade por ser um componente com potencial de imunossuprimir a resposta imune desde a fase de resposta inata até a adaptativa.

No presente trabalho é proposto obter anticorpos monoclonais e policlonais à leucotoxina e padronizar metodologia de determinação de nível de leucotoxina que poderão

ser úteis para o estudo futuro de patogenicidade. Utilizando essa metodologia também é proposto analisar o nível de leucotoxina em isolados clínicos de *A. actinomycetemcomitans*.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Bioética da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

Cultivo de *A. actinomycetemcomitans*

A cepa de referência ATCC 43718 sorotipo b e 30 isolados, sendo 08 provenientes de pacientes com periodontite agressiva e 22 de periodontite ulcerativa necrosante/SIDA (PUN/SIDA), mantidas no laboratório, foram cultivados em caldo infusão infuso cérebro-coração (BHI) suplementado com 0,5% de extrato de levedura em condições de microaerofilia e incubadas a 37°C por 72 horas.

Obtenção do extrato sonicado e do sobrenadante de cultura contendo leucotoxina

Amostras de extrato sonicado foram obtidas por meio de centrifugação de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 (item 3.1) (centrífuga: Himac CR 21: Hitachi, Japão) a 18.000 rpm durante 20 minutos, 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 descrito por Suzuki 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 desligado 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 aliquotados e armazenados a -80°C. Para a obtenção de leucotoxina sob forma solúvel, o sobrenadante de cultivo de Aa ATCC 43718 foi obtido por centrifugação a 18.000 rpm, a 4°C por 20 minutos. A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Lowry *et al.* (1951).

Cromatografia em coluna de *Sephadex G200*

Amostras de 2mL de extratos sonicados de *A.actinomycetemcomitans* ATCC 43718 foram aplicadas em coluna de *Sephadex G200* (2X50cm) equilibrada com PBS. Frações foram obtidas em coletor automático de frações (1mL em cada tubo). Foi feita a leitura em espectrofotômetro (Ultrospec-200, Pharmacia Biotech, UV/Visible) a 280nm para a quantificação de proteína. Foram consideradas como contendo a leucotoxina as frações de aproximadamente 150kDa baseado em resultados obtidos anteriormente (GUAZELI-AMIN *et al.*, 1998 e NAKAGAWA *et al.*, 2001).

Obtenção dos anticorpos monoclonais anti-leucotoxina *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718

As células P3U1 foram fundidas com células de baço de camundongos imunizados com leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 (item 3.3) por meio de PEG, 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.

Obtenção dos anticorpos policlonais anti-leucotoxina *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718

Amostras de 200µg de leucotoxina (fração I - coluna G200) de *A.actinomycetemcomitans* ATCC 43718 foram inoculadas subcutaneamente em coelhos. A primeira imunização foi realizada com 800µL de adjuvante completo de Freund para 800µL de leucotoxina. As imunizações seguintes ocorreram com 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, seguida de dosagem de proteína pelo método Lowry e colaboradores (1951).

Refracionamento da leucotoxina de *A. actinomycescomitans* pela coluna de afinidade iônica DEAE

Inicialmente a coluna foi carregada com solução de NaOH (0,5M, pH 8), em seguida, com a solução HCl (0,5M, pH 3). Depois de elevado o pH a aproximadamente 6,0 com a solução de acetato de amônio (0,5M, pH 8), foi passado 2mL de leucotoxina. As frações foram, então, eluídas com tampão gradiente formado por acetato de amônio a 0,5M e 6M, sob agitação.

Análise de reatividade dos anticorpos monoclonais e policlonais anti-leucotoxina de *A. actinomycescomitans* às frações de cromatografia

Placas de ELISA de 96 orifícios foram sensibilizadas com 50uL de cada fração (*Sephadex* ou DEAE) diluídas com 100μL de tampão carbonato-bicarbonato, em duplicata, incubada a 37°C por 1 hora e seguida de 18 horas a 4°C. Após bloqueio por 1 hora (leite desnatado 5% e tween20 a 0,5%, diluído em PBS) e lavagens (leite desnatado 0,5% diluído em PBS e tween20 a 0,05%), foram incubadas por 2 horas a 37°C com IgG monoclonal anti-leucotoxina de *A. actinomycescomitans*, e posteriormente, com 100μL de conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo (A-8924, SIGMA®), para anticorpos monoclonais. Para a análise de anticorpos policlonais, foram adicionados anticorpos de coelho e conjugado peroxidase anti-IgG de coelho. Após lavagem, foram adicionados 100μL de solução reveladora e a reação foi interrompida após 30 minutos com 50μL de solução ácido sulfúrico 4N. A leitura da placa foi realizada em leitor ELISA Multiskan EX (Uniscience – Labsystems) a $\lambda=492\text{nm}$.

Análise dos anticorpos monoclonais por *Western blotting*

Após eletroforese em gel gradiente 5-20% de poliacrilamida e *stacking* 3% de extrato sonificado de *A. actinomycescomitans* (diluído em tampão de amostra (v/v) e fervida) a 40mV na fase inicial (*stacking*) e a seguir a 80mV, realizou-se a transferência para uma membrana de nitrocelulose. A transferência foi realizada a 4°C, overnight a 20-30mV e em seguida mais uma hora a 80mV. Após bloqueio com tampão de bloqueio, a membrana foi lavada por três vezes com tampão de lavagem e cortada em tiras de aproximadamente três mm. Em seguida, cada uma destas tiras foi incubada com 500μL de amostras de anticorpos

monoclonais por uma hora e meia a temperatura ambiente. Após mais uma etapa de lavagem, foi adicionado conjugado-peroxidase anti-IgG de camundongo(1/8.000 – Sigma, USA) e nova incubação por uma hora a 37°C. A reação foi, então, revelada com solução de DAB e H₂O₂ e interrompida com água destilada.

Padronização da dosagem do nível de leucotoxina

A sensibilização da placa de ELISA foi realizada com a imunoglobulina G anti-leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* de coelho em diversas concentrações: 10, 15, 20, 25, 30, 50 e 100µg/mL diluídas em tampão carbonato-bicarbonato (100µL/pocinho) e incubada a 37°C por 1 hora, seguida de 18 horas a 4°C. Após o bloqueio por 1 hora à temperatura ambiente, foi feita 4 lavagens. Posteriormente, a placa foi incubada com a leucotoxina purificada de *A.actinomycetemcomitans* nas seguintes concentrações: 2.5, 5, 25, 50, 100 e 200µg/mL, em duplicata e incubadas a 37°C por 2 horas. Foi utilizado como leucotoxina purificada amostra de sobrenadante precipitado com sulfato de amônio de acordo com Kalachlany e colaboradores (2000), com pequena modificação. Para tanto amostra de sobrenadante de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 (37,5g/100mL de proteína) foi centrifugada a 13.000 rpm por 20 minutos e o *pellet* ressuspensão em tampão tris-HCl. Após diálise por 18 horas a 4°C e sucessivas centrifugações foi realizada a dosagem de proteína pelo método de Lowry e colaboradores (1951). Realizadas novas lavagens, a placa foi incubada com a IgG anti-leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* monoclonal nas diluições de 300, 600 e 900ng/mL e incubado a 37°C por 2 horas. Após a incubação e as quatro lavagens da placa, foi adicionado 100µL do conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo (Sigma A8924) diluído em tampão (1: 12.000) e incubados por 2 horas a 37°C. A revelação foi realizada com o OPD, paralisada com solução de ácido sulfúrico 4N e a leitura feita no aparelho Multiskan, a 492nm.

ELISA captura para análise do nível de leucotoxina em amostras de sobrenadante de cultivo de isolados clínicos de *A. actinomycetemcomitans*

A placa de ELISA foi sensibilizada com IgG anti-leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* de coelho para um volume final de 100µL/pocinho (100µg/mL) e incubada conforme citado

acima. Após o bloqueio e lavagens, a placa foi incubada com 100 μ L das amostras de isolados clínicos de *A. actinomycetemcomitans* em duplicata por 2 horas a 37°C. Repetida as lavagens, a placa foi incubada com IgG anti-leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 monoclonal (600ng/mL) por 2 horas a 37°C, seguida de conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo e solução reveladora.

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 $p < 0,05$.

RESULTADOS

Análise de reatividade dos anticorpos monoclonais e policlonais anti-leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* às frações de cromatografia

O processo de fracionamento de 3mL de leucotoxina parcialmente purificada através de coluna *Sephadex* G-200, resultou no perfil espectrofotométrico apresentado na Figura 1, com positividade por ELISA nas frações 3 a 18. Os nossos resultados de análise de anticorpos monoclonais e policlonais também têm demonstrado reconhecimento das mesmas frações obtidas por Guazeli-Amin *et al.*, 1998. O resultado de fracionamento por DEAE celulose está demonstrado na Figura 2. A análise das frações obtidas por DEAE celulose por ELISA demonstrou reconhecimento das frações 7 a 9 com anticorpos monoclonal ou policlonal.

Análise de anticorpos monoclonais por *Western-blotting*

A análise de anticorpo monoclonal anti-leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* por *Western-blotting* demonstrou reconhecimento de apenas uma banda com massa molecular aproximada de 150kDa (Figura 3).

Padronização de ELISA captura para dosagem de leucotoxina

Os resultados de ELISA demonstraram como concentração ideal para detecção de leucotoxina a concentração de IgG de coelho anti-leucotoxina e IgG monoclonal de camundongos como sendo de 100µg/mL e 600 ou 900ng/mL, respectivamente. A proporcionalidade foi observada nas concentrações entre 25 a 100µg/mL de leucotoxina (Figura 4).

Análise do nível de leucotoxina em sobrenadantes de isolados de *A. actinomycetemcomitans*

Os resultados do nível de leucotoxina em sobrenadantes de isolados de *A. actinomycetemcomitans* obtidos por ELISA captura estão demonstrados na tabela 1. A análise

estatística demonstrou nível mais elevado de leucotoxina em amostras de sobrenadante de *A.actinomyetemcomitans* provenientes de pacientes com periodontite agressiva (P.A) em relação ao do grupo PUN/SIDA ($p<0,05$) como mostra a Figura 5.

DISCUSSÃO

Para diagnóstico e monitoramento de tratamento de Periodontite Agressiva tem sido utilizado método de cultivo de *A. actinomycetemcomitans* em meio seletivo (SLOTS, 1982). Além disso, considerando a presença de *A. actinomycetemcomitans* produtor e não produtor de leucotoxina, após o cultivo, também tem sido realizada a análise de atividade biológica dos isolados clínicos utilizando metodologias de avaliação de citotoxicidade sobre neutrófilos (HAMMOND *et al.*, 1981), monócitos (GUAZELI-AMIN *et al.*, 1998) ou linhagem celular (NAKAGAWA *et al.*, 2001). Este método clássico inicial apresenta várias desvantagens por requerer meios complexos em anaerobiose e a demanda de longo tempo de cultivo que é ainda mais aumentada quando se associa a análise de atividade biológica de *A. actinomycetemcomitans*, devido à necessidade de fracionamento ou purificação de células (neutrófilos ou monócitos) ou, ainda, à necessidade de expansão de células em meios também complexos e de forma estéril.

Mais recentemente tem sido empregada a metodologia de biologia molecular utilizando PCR para detecção de *A. actinomycetemcomitans* (CORTELLI *et al.*, 2005) ou para detecção e identificação de *A. actinomycetemcomitans* alto ou baixo produtor de leucotoxina (JUNIOR *et al.*, 2006). Esta metodologia apresenta a vantagem de ser mais rápida, porém, mesmo assim, a metodologia disponível no momento não é quantitativa.

Assim, no presente trabalho foi introduzida a metodologia imunológica que apresenta vantagens como a rapidez, a sensibilidade e a possibilidade de ser automatizada. Para tanto, foram obtidos anticorpos monoclonais e policlonais a leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* por imunizações de camundongos e coelho. A leucotoxina utilizada para imunização foi obtida por fracionamento em coluna de *Sephadex* G-200 (fração I), portanto, trata-se de fração semi-purificada considerando que no processo de purificação ocorre declínio significativo na atividade leucotóxica. Este declínio pode ser observado quando a fração obtida por cromatografia em gel filtração é refracionada em coluna de troca iônica (GUAZELI-AMIN *et al.*, 1998). A perda substancial da atividade biológica da leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* também foi descrita por Dirienzo e colaboradores (1986) em processos de purificação por cromatografia de afinidade utilizando anticorpos monoclonais.

Essa fração I utilizada contém a leucotoxina como verificado por teste anterior de liberação de LDH pela linhagem celular P3U1 e por eletroforese em gel de poliacrilamida que

demonstrou a presença de uma banda de massa molecular aparente de 150 kDa, compatível com o peso molecular da leucotoxina (NAKAGAWA *et al.*, 2001).

Os resultados de análise de anticorpos policlonais e monoclonais (Fig. 1) deste estudo também têm demonstrado reconhecimento das mesmas frações de *Sephadex* G-200 obtidas por Guazeli-Amin e colaboradores (1998). E, as mesmas frações de cromatografia DEAE foram reconhecidas por anticorpos monoclonais e policlonais (Fig. 2), sugerindo que os anticorpos obtidos são específicos às frações de leucotoxina. Todavia, são necessários estudos adicionais de melhor caracterização. Os resultados da análise de anticorpos monoclonais demonstraram reconhecimento de banda de aproximadamente 150kDa por *Western blotting* (Fig. 3).

Utilizando estes anticorpos, foi padronizada a dosagem do nível de leucotoxina, sendo considerada como concentração ideal para detecção de leucotoxina a concentração de IgG de coelho anti-leucotoxina e IgG monoclonal de camundongos como sendo de 100µg/mL e 600 ou 900ng/mL, respectivamente, permitindo a detecção de leucotoxina nas concentrações de 25 a 100µg/mL (Fig 4). A amostra padrão foi obtida por processo de precipitação de sobrenadante de cultivo, considerado como processo ideal de purificação de leucotoxina, por ser metodologia rápida e fácil de obtenção de acordo com Kalachlany e colaboradores (2000). Embora, seja considerada metodologia ideal de purificação, por não ter sido utilizado uma membrana de filtração no presente trabalho, a fração pode conter outras impurezas, e possivelmente a nossa a sensibilidade seja superior, ou seja menor que de 25µg/mL.

Após a padronização, as amostras de sobrenadantes de *A. actinomycetemcomitans* isolados de pacientes com PA e com PUN/SIDA foram analisadas por ELISA captura. Os resultados obtidos em D.O. demonstraram nível superior de leucotoxina em amostras provenientes de pacientes com PA em relação ao de PUN/SIDA ($p < 0.05$). Os resultados do presente trabalho corroboram com o conceito de que *A. actinomycetemcomitans* proveniente de pacientes com PA é mais leucotóxica (CORTELLI *et al.*, 2005).

De 43 a 75% de isolados clínicos de *A. actinomycetemcomitans* provenientes de pacientes com doença periodontal são produtores de leucotoxina, enquanto que mais de 80% dos isolados de indivíduos saudáveis são não produtores de leucotoxina (BAEHNI *et al.*, 1981; ZAMBON *et al.*, 1985). Considerando ainda que a frequência de 36% de indivíduos saudáveis (KILLIAN & SCHIOTT, 1975) e 34% de pacientes com AIDS (ZAMBON *et al.*, 1990) podem apresentar *A. actinomycetemcomitans*, possivelmente a lesão nos pacientes com SIDA pode ser devido ao aumento na concentração de *A. actinomycetemcomitans* que não

expressam grande quantidade de leucotoxina e associada também ao crescimento de outros microorganismos. A doença imunossupressiva como a SIDA pode favorecer a instalação e progressão mais rápida de *A. actinomycetemcomitans* e outros patógenos bucais. *A. actinomycetemcomitans*, principalmente, somado a imunidade baixa do paciente e sua capacidade de interferir no processo inflamatório local são facilmente isolados nestes pacientes (MINTZ & FIVES-TAYLOR, 1994). O nível relativamente baixo de leucotoxina encontrado em isolados de pacientes com SIDA talvez não condiga com a facilidade do seu isolamento. Mas, deve-se considerar que a condição crônica da doença pode levar *A. actinomycetemcomitans* a expressar outro fator de virulência que não seja exatamente a leucotoxina. Ou, ainda, que essa doença bucal persista por ação de outro patógeno periodontal (DZINK, *et al.*, 1985).

Os resultados obtidos também demonstraram heterogeneidade nos níveis de leucotoxina em diferentes isolados de *A. actinomycetemcomitans*, corroborando com os resultados de literatura que demonstraram que tal microrganismo não é 100% produtor de leucotoxina independentemente da origem (BAEHNI *et. al.*, 1981, ZAMBON, 1985). Porém, são necessários estudos adicionais para esta conclusão.

Este trabalho é pioneiro na dosagem de leucotoxina por ELISA e, por ser uma metodologia que pode ser automatizada, existe o potencial de se realizar a análise de grande amostragem e, portanto, com muita valia para estudos epidemiológicos ou acompanhamento de tratamento. Todavia, para fins de diagnóstico, ainda são necessários estudos adicionais comparando com os resultados de investigações por métodos clássicos, bem como com a PCR em tempo real.

CONCLUSÕES

1. Os anticorpos monoclonais e policlonais obtidos reconhecem as mesmas frações cromatográficas contendo leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* podendo ambos, serem utilizados para a detecção de fração de leucotoxina.
2. A associação dos anticorpos monoclonais e policlonais permite a dosagem do nível de leucotoxina por ELISA com sensibilidade de detecção mínima de 25µg/mL.
3. Os níveis de leucotoxina detectados por ELISA em sobrenadantes de cultivo são significativamente maiores em isolados de *A. actinomycetemcomitans* provenientes de pacientes com PA em relação aos com PUN/SIDA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAEHNI, P.C.; TSAI, C.C.; McARTHUR, W.P.; HAMMOND, B.F.; SHENKER, B.J.; TAICHMAN, N.S. Leukotoxic activity in different strains of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from juvenile periodontitis in man. **Arch. Oral Biol.**, v.26, n.8, p.671-676, 1981.

CHAVES, E.S; JEFFCOAT, M.K.; RYERSON, C.C.; SNYDER, B. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. **J. Clin. Periodontol.**, v.27, n.12, p. 897–903, 2000.

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, n.8, p. 860–866, 2005.

DiRIENZO, J.M. Application of monoclonal antibodies to the study of oral bacteria and their virulence factors. In: MACARIO, A.J.L.; MACARIO, E.C. **Monoclonal antibodies against bacteria**. New York:Academic Press. p.249-293, 1986.

DZINK, J.L.; TANNER, A.C.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. **J. Clin. Periodontol.**, v.12, n.8, p.648-659, 1985.

GUAZELI-AMIN, V. H. Análise da atividade leucotóxica de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e do efeito neutralizador de anticorpos antileucotoxina. Londrina, 1998. 67 p. Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina.

HAMMOND, B.F; DARKES, M.; LAI, C-H.; TSAI, C. C. **J. Dent. Res.** 60A:333, abstr. no.89, 1981.

JARAMILLO, A.; ARCE, R.M.; HERRERA, D.; BETANCOURTH, M.; BOTERO, J.E.; CONTRERAS, A. Clinical and microbiological characterization of periodontal abscesses. **J. Clin. Periodontol.**, v.32, n.12, p.1213–1218, 2005.

JUNIOR, W.R.; ANDRADE, A.F.B.; COLOMBO, A.P. V. Prevalence of leukotoxin genotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en Brazilians with chronic periodontites. **Braz. J. of Microbiol.**, v.37, p.590-596, 2006.

KACHLANY, S.C; FINE, D.H.; FIGURSKI, D.H. Secretion of RTX leukotoxin by *A. actinomycetemcomitans*. **Infec. Immun.**, v.68, n.11, p. 6094-6100, 2000.

KATO, S.; KOWASHI, Y.; DEMUTH, D.R. Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. **Microb. Pathog.**, v. 32, n.1, p. 1-13, 2002.

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

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.; WAHL, S. M. Lethal effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human T lymphocytes. **Infect. Immun.**, v.59, n.9, p.3267-3272, 1991.

MINTZ, K.P.; FIVES-TAYLOR, P.M. Identification of an immunoglobulin Fc receptor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infec. Immun.**, v.62, n.10, p.4500-4505, 1994.

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. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v.15, n.1, p.05-11. 2001.

PADILLA, C.; LOBOS, O.; HUBERT, E.; GONZÁLEZ, C.; MATUS, S.; PEREIRA, M.; HASBUN, S.; DESCOUVIERES C. Periodontal pathogens in atheromatous plaques isolated from patients with chronic periodontitis. **J. Periodontal. Res.**, v.41, n.4, p.350-353, 2006.

SHENKER, B.J.; TSAI, C.C.; TAICHMAN, N.S. Suppression of lymphocyte responses by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Periodontal. Res.**, v.17, n.5, p.462-465, 1982.

SLOTS, J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Clin. Microbiol.**, v.15, n.4 , p.606-609, 1982.

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

SUZUKI, J.B.; PARK, S.K.; FALKER, W.A. Immunologic profile of juvenile periodontitis. I. Lymphocyte blastogenesis and the autologous mixed lymphocyte response. **J. Periodontol.**, v.55, n.8, p.453-460, 1984.

TAICHMAN, N. S.; WILTON, J.M.A. Leukotoxicity of an extract from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* for human gingival polymorphonuclear leukocytes. **Inflammation.**, v.5, n.1, p.1-12, 1981.

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

ZAMBON, J.J; REYNOLDS, H.S; GENCO, R. J., Studies of the subgingival microflora in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **J. Periodontol.**, v. 51; p.699-704, 1990.

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.

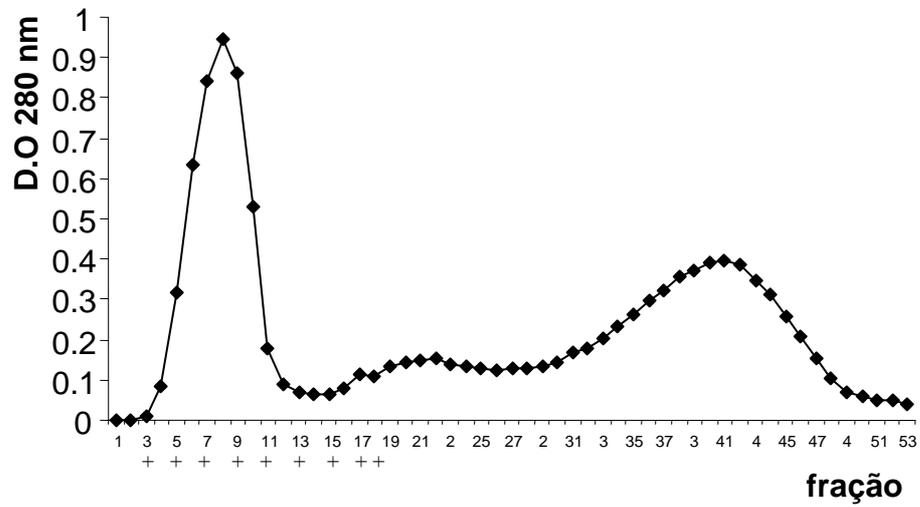


Figura 1 – Fracionamento de leucotoxina em coluna *Sephadex G-200*, reatividade das frações com anticorpos monoclonal e policlonal. Amostras de leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* cepa ATCC 43718 foram submetidas à cromatografia por gel filtração em *Sephadex G200*. O perfil espectrofotométrico foi construído com base nos resultados expressos em absorvância a $\lambda = 280\text{nm}$. O resultado de ELISA com anticorpos monoclonais e policlonais demonstraram maior intensidade de reação nas frações 3 a 18 (+).

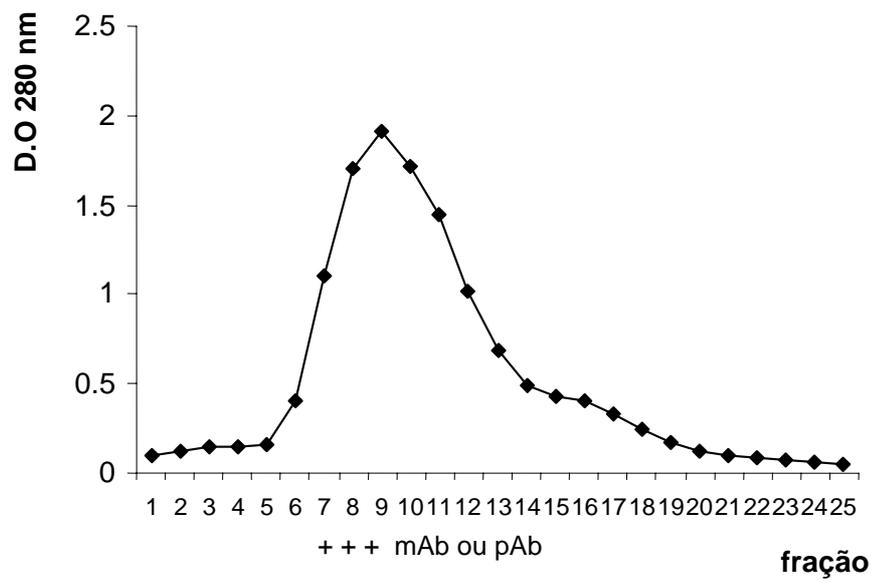


Figura 2 – Análise das frações obtidos pela coluna de DEAE. As frações analisadas por espectrofotometria a 280nm e por ELISA utilizando anticorpos monoclonais (mAb) ou policlonais (pAb). A reatividade positiva foi observada com as amostras das frações 7 a 9 (+), tanto com mAb como pAb.



Figura 3 – *Western blotting*. Resultado da análise de reatividade de anticorpos monoclonais a amostra de extrato sonificado de *A. actinomycetemcomitans* cepa ATCC 43718 submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida, seguida de transferência a membrana de nitrocelulose. O resultado demonstra reconhecimento de apenas uma banda com massa molecular aproximada de 115~150kDa.

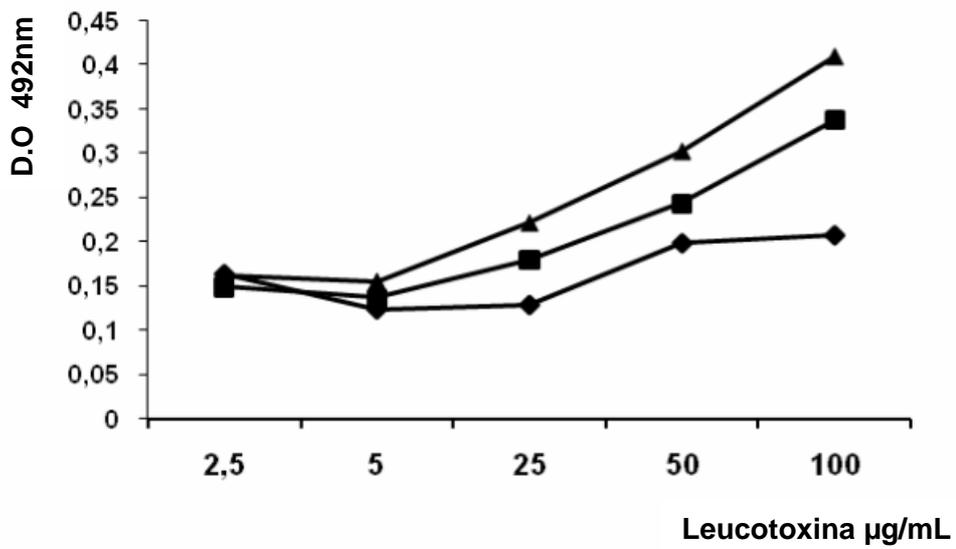


Figura 4 – Resultado da padronização de ELISA captura para dosagem do nível de leucotoxina.

A reação de ELISA demonstrou, para sensibilização da placa de 96 orifícios a concentração ideal de 100µg/mL IgG de coelho anti-leucotoxina e 600 ou 900ng/mL de IgG monoclonal de camundongos (300ng/mL (▲), 600ng/mL (■) e 900ng/mL (◆), para detecção de leucotoxina na concentração de 25 a 100µg/ml.

Tabela 1 – Análise do nível de leucotoxina em sobrenadantes de isolados de *A. actinomycetemcomitans*.

AMOSTRAS	D.O 492nm
Cepa de referência ATCC 43718	0,222 ± 0,0120
Isolados de Pacientes Periodontite Agressiva (Grupo P.A)	PA1 0,243 ± 0,0155 PA2 0,125 ± 0,0169 PA3 0,277 ± 0,0022 PA4 0,214 ± 0,0233 PA5 0,093 ± 0,0021 PA6 0,206 ± 0,0459 PA7 0,156 ± 0,0579 PA8 0,209 ± 0,0268 0,190375 ± 0,0574
Isolados de Pacientes com PC associada a AIDS (Grupo PUN/SIDA)	AD1 0,174 ± 0,0127 AD2 0,142 ± 0,0007 AD3 0,204 ± 0,0120 AD4 0,169 ± 0,0162 AD5 0,068 ± 0,0212 AD6 0,051 ± 0,0007 AD7 0,154 ± 0,0106 AD8 0,111 ± 0,0233 AD9 0,055 ± 0,0084 AD10 0,094 ± 0,0120 AD11 0,170 ± 0,0148 AD12 0,074 ± 0,0084 AD13 0,098 ± 0,0127 AD14 0,113 ± 0,0346 AD15 0,133 ± 0,0296 AD16 0,069 ± 0,0063 AD17 0,093 ± 0,0106 AD18 0,087 ± 0,0098
Isolados de Pacientes com PC associada a AIDS (Grupo PUN/SIDA)	

AD19 $0,059 \pm 0,0007$

AD20 $0,140 \pm 0,0106$

AD21 $0,093 \pm 0,0438$

AD22 $0,079 \pm 0,0063$

$0,110455 \pm 0,0430$

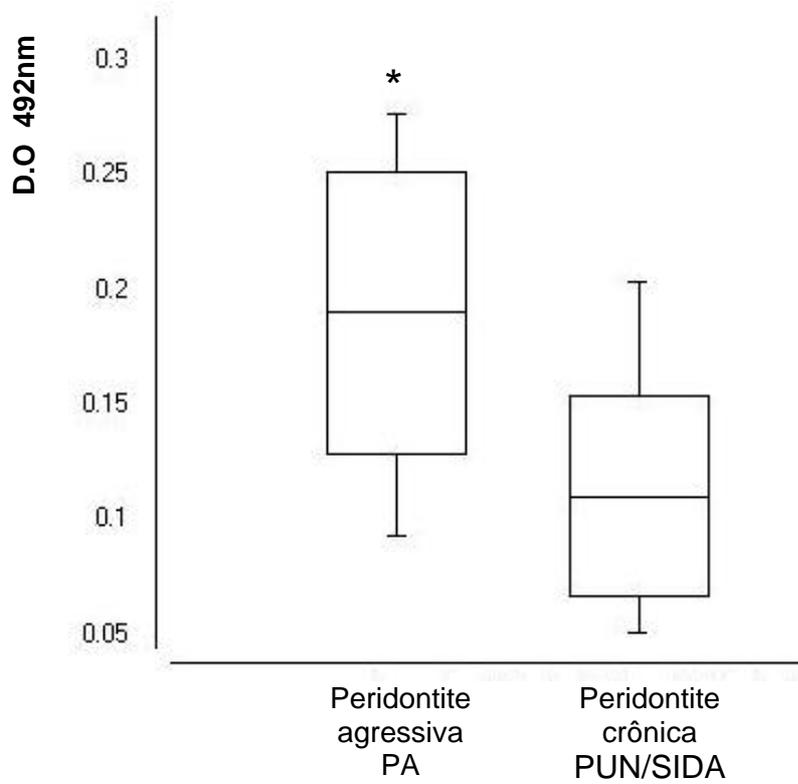


Figura 5 – Análise do nível de leucotoxina em sobrenadantes de isolados de *A. actinomycetemcomitans*. Análise estatística pelo teste ANOVA, seguido pelo de Tukey, demonstrou que a média do grupo periodontite agressiva (PA) foi superior (*) ao grupo periodontite crônico (PUN/SIDA) considerando $p < 0,05$.