

**FLÁVIA SAMMARTINO MARIANO RODRIGUES**

**INFLUÊNCIA DE PERIODONTOPATÓGENOS NA  
EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS  
ANTIMICROBIANOS E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS  
EM NEUTRÓFILOS DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E  
COM PERIODONTITE**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de doutora em Biologia Buco-Dental, área de Microbiologia e Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

**PIRACICABA**

**2010**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

M337i

Mariano, Flávia Sammartino.

Influência de periodontopatógenos na expressão e produção de peptídeos antimicrobianos e citocinas inflamatórias em neutrófilos de indivíduos saudáveis e com periodontite / Flávia Sammartino Mariano Rodrigues. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Reginaldo Bruno Gonçalves.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Óxido nítrico. 2. Inflamação. 3. Doença periodontal. 4. Imunidade inata. 5. Imunidade adaptativa. I. Gonçalves, Reginaldo Bruno. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Periodontopathogens influence in the expression and production of antimicrobial peptides and inflammatory cytokines in neutrophils from healthy and periodontitis individuals

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Nitric oxide. 2. Inflammation. 3. Periodontal disease. 4. Adaptive immunity. 5. Innate immunity

Área de Concentração: Microbiologia e Imunologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Reginaldo Bruno Gonçalves, Gustavo Pompermaier Garlet, Poliana Mendes Duarte, Francisco Humberto Nociti Júnior, José Francisco Höfling

Data da Defesa: 11-06-2010

Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 11 de Junho de 2010, considerou a candidata FLÁVIA SAMMARTINO MARIANO RODRIGUES aprovada.

Prof. Dr. REGINALDO BRUNO GONCALVES

Prof. Dr. GUSTAVO POMPERMAIER GARLET

Profa. Dra. POLIANA MENDES DUARTE

Prof. Dr. FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JÚNIOR

Prof. Dr. JOSE FRANCISCO HOFLING

*Com todo o meu carinho e gratidão, dedico este trabalho à minha família e ao meu esposo Maurício, pelo imenso amor, apoio e compreensão oferecidos durante todos os momentos vividos.*

## **AGRADECIMENTOS**

### **Agradeço,**

À Universidade Estadual de Campinas, representada pelo Reitor Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa; à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, representada pelo Diretor Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, pelo Coordenador do Programa de Pós-Graduação Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior, pela oportunidade concedida.

Aos examinadores que compuseram a banca da tese: Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior, Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet, Prof. Dr. José Francisco Höfling, Profa. Dra. Poliana Mendes Duarte, pela grande contribuição na elaboração da tese.

Aos examinadores que compuseram a banca suplente da tese: Prof. Dr. Marcelo Henrique Napimoga, Prof. Dr. Ricardo Della Coletta e Dra. Thaís Helena Gasparoto.

Aos examinadores que compuseram a banca de qualificação: Prof. Dr. Edgard Graner, Profa. Dra. Regianne Umeko Kamiya e Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos Graner, pelas sugestões para a finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves, pela orientação, pelo apoio e pela confiança em mim e em meu trabalho.

Aos colaboradores Profa. Dra. Ana Paula Campanelli e Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior, pela amizade, participação ativa e direta na realização deste trabalho e pelos grandes conhecimentos científicos adquiridos.

Aos Profs. Drs. Enilson Antônio Sallum e Márcio Zaffalon Casati, e aos alunos do Departamento de Periodontia e da Clínica de Especialização desta Faculdade, pelo espaço cedido e imensurável ajuda na seleção dos voluntários que participaram desta pesquisa.

Às colaboradoras Thaís H. Gasparoto e Thaisângela Rodrigues L. S. Gomes, pela amizade, pela disponibilidade e pelos conhecimentos trocados nas discussões científicas.

Aos professores do Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos Graner, Prof. Dr. José Francisco Höfling e Prof. Dr. Daniel Saito pela acessibilidade e incentivo dados durante meu doutoramento.

Aos funcionários do laboratório, querida Wilma C. Ferraz pela participação nas coletas de sangue, pelo apoio e palavras de incentivo e Anderson L. Teixeira pela atenção e acessibilidade em todos os momentos requisitados.

Aos queridos amigos do laboratório de Microbiologia e Imunologia, Cristiane Duque, Erika H. Chú, Ítalo Sato, Iza T. A. Peixoto, Janaina C. O. Sardi, Juliana J. Moraes, Natália L. Vizoto, Paula C. Anibal, Rafael N. Stipp, Regianne U. Kamiya, Sérgio E. B. da Cruz e Tiago Taiete pelo excelente convívio, pelo apoio e por compartilharmos conhecimentos científicos, ansiedades e cada conquista alcançada.

Aos voluntários que participaram desta pesquisa doando amostras de sangue, meus sinceros agradecimentos.

A todas as pessoas que indiretamente colaboraram com a concretização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

*Sonhe com aquilo que você quer ser,  
porque você possui apenas uma vida  
e nela só se tem uma chance  
de fazer aquilo que quer.*

*Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.  
Dificuldades para fazê-la forte.  
Tristeza para fazê-la humana.  
E esperança suficiente para fazê-la feliz.*

*As pessoas mais felizes não tem as melhores  
coisas.  
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades  
que aparecem em seus caminhos.*

*A felicidade aparece para aqueles que choram.  
Para aqueles que se machucam  
Para aqueles que buscam e tentam sempre.  
E para aqueles que reconhecem  
a importância das pessoas que passaram por  
suas vidas.*

Clarice Lispector

## RESUMO

Dentre os mecanismos da imunidade inata, os quais são importantes para a proteção da cavidade oral, podemos citar os peptídeos antimicrobianos e células fagocíticas como os neutrófilos. Os peptídeos antimicrobianos, LL-37 e  $\alpha$ -defensinas ou peptídeos de neutrófilos humanos (HNP 1-3) são produzidos por neutrófilos e têm ampla atividade contra bactérias, fungos e vírus envelopados, um mecanismo microbicida independente de oxigênio. Contudo, os neutrófilos também executam atividade antimicrobiana através da produção de óxido nítrico (NO) durante a fagocitose. Adicionalmente, estas células produzem diferentes citocinas em resposta aos patógenos. Sendo assim, os neutrófilos tornam-se importantes na resposta contra a doença periodontal, mas, não está bem descrito se há diferenças funcionais entre os neutrófilos de pacientes com periodontite e os de indivíduos saudáveis após estimulação destes com lipopolossacarídeo (LPS) de periodontopatógenos. Dessa forma, avaliamos os níveis de LL-37, HNP1-3, NO e citocinas no sobrenadante das culturas de neutrófilos de voluntários com e sem periodontite e estimulados com LPS de *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e *Escherichia coli* (Ec), bem como analisamos a expressão de RNAm, para esses peptídeos e citocinas nessas células. Nossos resultados demonstraram que neutrófilos de voluntários com periodontite estimulados com LPS de Aa expressaram maiores níveis de RNAm de LL-37, HNP 1-3 e IFN- $\gamma$ , bem como produziram maiores quantidades de IL-12 e IFN- $\gamma$  quando comparados aos saudáveis. LPS de Pg e Ec aumentaram significativamente a expressão de HNP 1-3, IFN- $\gamma$  e IL-8, bem como a produção de LL-37, IL-12 e IFN- $\gamma$ . Em contrapartida, neutrófilos de pacientes com periodontite produziram níveis reduzidos de NO e nenhuma diferença foi observada na expressão de IL-12 e na produção de HNP 1-3 entre ambos os grupos de voluntários estudados. Estes dados permitem concluir que neutrófilos de pacientes com periodontite respondem de forma mais intensa aos estímulos de LPS de bactérias periodontopatogênicas em comparação aos neutrófilos de voluntários com periodonto saudável.

Palavras-chave: doença periodontal, LL-37,  $\alpha$ -defensina, óxido nítrico, citocinas, neutrófilos.



## ABSTRACT

Among the innate mechanisms, which are essential for the oral cavity protection, we can include antimicrobial peptides and phagocytic cells such as neutrophils, as a major. Antimicrobial peptides, LL-37 and  $\alpha$ -defensins or human neutrophil peptides (HNP 1-3) are produced by neutrophils and have broad activity against bacteria, fungi and enveloped viruses, an oxygen-independent microbicidal mechanism. However, neutrophils also do antimicrobial activity through nitric oxide (NO) production in phagocytosis. Also, neutrophils produce special cytokines against pathogens. Thus, neutrophils are central in the periodontal disease response, but is unclear the functional differences between neutrophils from periodontitis and healthy volunteers post-stimulation with periodopathogens lipopolossacarideo (LPS). Then, we studied of LL-37, HNP1-3, NO and cytokines levels in culture supernatants of cells from volunteers with or without periodontitis post *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) and *Escherichia coli* (Ec) LPS. We analyzed also peptides and cytokines expression in these cells. We show that neutrophils from periodontitis volunteers cultured with Aa LPS expressed higher LL-37, HNP 1-3 and IFN- $\gamma$  mRNA and produced more IL-12 and IFN- $\gamma$  levels as the controls. Pg and Ec LPS notably improved the HNP1-3, IFN- $\gamma$  and IL-8 expression and the LL-37, IL-12 and IFN- $\gamma$  secretion. But, neutrophils from periodontitis patients produced low NO levels and similar IL-12 mRNA and HNP 1-3 production in both the volunteers groups studied. Briefly, we can conclude that neutrophils from periodontitis patients respond more strongly than healthy neutrophils when stimulated with LPS periodontopathic bacterias.

Keywords: periodontal disease, LL-37,  $\alpha$ -defensin, nitric oxide, cytokines, neutrophil.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
cDNA	Ácido ribonucléico complementar
DEPC	Dietilpirocarbonato
DO	Densidade óptica
Ec	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FMLP	Formil-metionil-leucil-fenil-alanina
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
hCAP18	Catelicidina CAP18 humana
HNP	Peptídeo de neutrófilos humanos
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
NK	Células natural killer ou matadores naturais
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato
Pg	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
RNA	Ácido desoxirribonucléico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
Th1	Célula T auxiliadora tipo 1
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
3. PROPOSIÇÃO .....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	16
5. RESULTADOS .....	26
6. DISCUSSÃO .....	42
7. CONCLUSÃO .....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55

# 1. INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que envolve presença de uma ampla variedade de espécies bacterianas no biofilme dental. Dentre as espécies, há algumas classificadas como periodontopatogênicas por estarem frequentemente associadas ao desenvolvimento da periodontite, a exemplos destas temos *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e *Porphyromonas gingivalis* (Pg), entre outras (Slots & Ting 1999; Nishihara *et al.*, 2004; Hajishengallis 2009). O desenvolvimento da periodontite também está associado ao estado imunológico do indivíduo, que, somado aos fatores genéticos e ambientais, hábitos de higiene oral, consumo de tabaco e álcool podem causar um aumento na suscetibilidade à doença (Enberg *et al.*, 2001; Moimaz *et al.*, 2009). A progressão da periodontite resulta em destruição dos tecidos que suportam os dentes, incluindo ligamentos e ossos alveolares e, em casos mais avançados, ocorre a perda dos dentes acometidos (Flemmig 1999; Yücel *et al.*, 2008). Adicionalmente, maiores prejuízos à saúde do paciente podem ser gerados em decorrência desta doença, como disfunções mastigatórias e aumento dos índices de problemas cardíacos como a doença coronariana cardíaca, devido ao intenso número de bactérias que podem disseminar-se através do biofilme por órgãos e/ou tecidos via corrente sanguínea (Johansson *et al.*, 2006; Berent *et al.*, 2010).

A presença destes microrganismos nos tecidos do hospedeiro resulta na ativação de mecanismos imunológicos, como os desempenhados por células polimofonucleares como

os neutrófilos, por exemplo. Tais células possuem destacada capacidade de produzirem peptídeos antimicrobianos LL-37 e HNP 1-3, citocinas e óxido nítrico (NO) contra estímulos patogênicos. Está bem descrito na literatura que uma redução no número ou na função destas células resulta no desenvolvimento de intensa periodontite, ilustrando o importante papel dos neutrófilos na resposta contra esta doença periodontal.

Diversos estudos sugerem que espécies bacterianas como *Helicobacter pylori*, *Streptococcus* spp, *Mycobacterium tuberculosis*, *Fusobacterium nucleatum*, Aa e Pg induzem diferentes mecanismos da resposta imunológica. Dentre estes podemos citar a expressão de RNA mensageiro (RNAm) e a produção de peptídeos antimicrobianos LL-37 e  $\alpha$ -defensina, também chamada HNP 1-3. Ainda, há produção de quantidades representativas de diversas citocinas e NO, os quais podem exercer importantes atividades microbidas contra os patógenos invasores. Das células do sistema imune que são ativadas e que respondem eficientemente aos estímulos bacterianos podemos citar as mononucleares, as polimorfonucleares, além de outras presentes em epitélios como as células epiteliais gástricas, respiratórias e gengivais.

Segundo Hosokawa e colaboradores (2006), a síntese da catelicidina LL-37 parece ser elevada em culturas de células epiteliais gengivais estimuladas por determinadas bactérias orais. Porém, ainda não está muito bem elucidado como é a síntese desta catelicidina e das HNP 1-3 em neutrófilos isolados de pacientes com periodontite e estimulados com tais bactérias em comparação às mesmas células originárias de voluntários com periodonto saudável. Entretanto, a existência de diferenças nestes mecanismos microbidas desempenhados pelos neutrófilos durante a periodontite poderia fornecer

maiores informações sobre a suscetibilidade de alguns indivíduos ao desenvolvimento desta doença.

# 1. REVISÃO DE LITERATURA

A destruição dos tecidos periodontais observada durante a periodontite pode ser controlada por diferentes mecanismos que compõem a resposta imune do hospedeiro. Dentre eles, destacamos o importante papel de células inflamatórias como os neutrófilos, que são os primeiros a serem recrutados para o foco infeccioso, exercendo diferentes formas de defesa contra microrganismos invasores (Lundy *et al.*, 2005; Wahaidi *et al.*, 2009).

A migração de neutrófilos circulantes para tecidos inflamatórios é mediada por quimiocinas e seus receptores de superfícies, como o receptor de quimiocina cisteína-X-cisteína (CXCR1), o qual é expresso predominantemente em neutrófilos (Tarlowe *et al.*, 2003). Acompanhado do CXCR1, enfatizamos a expressão constitutiva do complexo de ativação de membrana-1 (Mac-1), um membro da família de integrinas CD18 leucócitos-específicos, composta por CD11b/CD18, contudo, após estimulação destas células nota-se um aumento nos níveis moleculares de Mac-1 (Orr *et al.*, 2007), favorecendo a migração dos neutrófilos para o microambiente inflamatório. Ainda, moléculas de CD62L são capazes de promover a adesão de neutrófilos em células endoteliais durante estímulos inflamatórios (Menezes *et al.*, 2009; Hirahashi *et al.*, 2009) e sua redução rápida após estimulação destas células permite que os leucócitos destaquem-se das células endoteliais, onde estão aderidos e transmigram para os tecidos inflamados (Kishimoto *et al.*, 1989; Griffin *et al.*, 1990; Vega *et al.*, 2010). Ainda, receptores de alta afinidade da região Fc de

anticorpos da classe IgG conhecidas como CD64, são encontrados em baixas concentrações em neutrófilos em repouso, aumentando sua expressão após ativação celular (Ng *et al.*, 2006; Cid *et al.*, 2010). Por último, neutrófilos ainda expressam mRNA para quase todas as moléculas de receptores tipo Toll (TLR), as quais, após serem expressas, são capazes de reconhecer padrões moleculares associados à patógenos (PRR), iniciando mecanismos ativadores da resposta inume (Hayashi *et al.*, 2003; Parker *et al.*, 2005).

Depois de migrarem da circulação para o ambiente inflamatório, os neutrófilos iniciam variados mecanismos de defesa com funções microbidas. A importância destas células no desenvolvimento da periodontite, especificamente, tem sido amplamente demonstrada por diversos estudos (Miller *et al.*, 1984; Van Dyke & Hoop, 1990; Del Fabbro *et al.*, 2000; Carlsson *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2007), os quais enfatizam que na ausência de neutrófilos há representativo aumento no desenvolvimento dessa doença oral. Em resposta às bactérias, aos produtos bacterianos como LPS e aos mediadores inflamatórios, os neutrófilos aumentam seu poder quimiotático, fagocítico e microbida, promovendo a morte dos microrganismos por mecanismos independentes e/ou dependentes da produção de oxigênio (Kobayashi *et al.*, 2003).

Os mecanismos independentes de oxigênio podem ser representados pela eficiente produção de peptídeos antimicrobianos como catelicidinas e defensinas. As catelicidinas correspondem a uma família de peptídeos antimicrobianos que são encontrados principalmente em grânulos secundários de neutrófilos e expressas inicialmente na diferenciação mielóide destas células (Weinrauch *et al.*, 1995; Levy, 1996; Ganz & Lehrer, 1997). Os humanos possuem uma única catelicidina com 18kDa, a FALL39, também



conhecida por CAP18 humana (hCAP18) ou LL-37 (Dale & Krisanaprakornkit, 2001; Golec 2007), a qual é produzida também por queratinócitos, células epiteliais da pele (Frohm *et al.*, 1997), epitélio oral escamoso não queratinizado (Frohm Nilsson *et al.*, 1999), leucócitos (Cowland *et al.*, 1995), células do trato gastrintestinal (Hase *et al.*, 2002), do trato respiratório (Bals *et al.*, 1998; Frohm Nilsson *et al.*, 1999), sendo encontrada ainda na saliva e no tecido gengival (Guthmiller *et al.*, 2001; Murakami *et al.*, 2002; Hosokawa *et al.*, 2006). Estruturalmente, as catelicidinas são caracterizadas por sequências de catelinas altamente conservadas e sem a presença das pontes dissulfídicas internas (Larrick *et al.*, 1994; Larrick *et al.*, 1995). A LL-37 é uma molécula alfa-helicoidal, formada por 37 resíduos de aminoácidos originados da clivagem de hCAP18 pela proteinase 3 (Tanaka *et al.*, 2000; De Yang *et al.*, 2000; Lehrer, 2004; Golec 2007; Wang, 2010).

A importância biológica da classe das catelicidinas como LL-37 pode ser demonstrada em camundongos geneticamente deficientes para este peptídeo, os quais são mais susceptíveis às infecções bacterianas (Nizet *et al.*, 2001), sugerindo deste modo, um papel fundamental de LL-37 na proteção do hospedeiro à colonização por bactérias. Mais especificamente, a catelicidina LL-37 tem sido descrita exercer uma função evidente na proteção oral, uma vez que pacientes acometidos pela “Síndrome Morbus Kostmann”, doença caracterizada pela presença de grave neutropenia associada à deficiência na produção desse peptídeo, desenvolvem quadros de intensa doença periodontal (Pütsep *et al.*, 2002; Doss *et al.*, 2010).

Aparentemente, os mecanismos envolvidos na obtenção do efeito antimicrobiano exercido por LL-37 incluem ação direta e indireta deste peptídeo contra os patógenos. A

interação direta de LL-37 inclui a formação de poros na bicamada lipídica dos microrganismos, o chamado poro toroidal (Henzler *et al.*, 2003). Tal estrutura origina-se pela deposição dos peptídeos LL-37 de forma paralela à membrana dos patógenos, em seguida, as moléculas helicoidais de LL-37 inserem-se na bicamada lipídica através de suas regiões hidrofóbicas e promovem a curvatura ou dobramento dessa membrana, originando o poro. Tais poros formados permitem o escape de íons e moléculas do microrganismo para o meio externo, acarretando a morte da célula em questão (Hancock, 1997; Henzler *et al.*, 2003; Brogden, 2005).

Indiretamente, o peptídeo LL-37 pode estimular quimiotaxia de neutrófilos, monócitos e células T (De Yang *et al.*, 2000; Doss *et al.*, 2010); estimular liberação de quimiocinas (Scott *et al.*, 2002), de histamina por mastócitos (Niyonsaba *et al.*, 2001; Niyonsaba *et al.*, 2002); promover angiogênese (Koczulla *et al.*, 2003); modular a diferenciação de células dendríticas e reduzir a produção de citocinas inflamatórias como o TNF- $\alpha$  por monócitos, em resposta ao LPS e outros ligantes de TLR (Yang *et al.*, 2000; Mookherjee *et al.*, 2006; Doss *et al.*, 2010). Adicionalmente, o peptídeo apresenta alta afinidade por LPS e compete com ele para se ligar em receptores específicos, como o CD14. Desse modo, pode agir sobre microrganismos que apresentam esta molécula em sua composição, neutralizando a capacidade tóxica do LPS e protegendo o hospedeiro da ação destas endotoxinas (Ciornei *et al.*, 2005; Rosenfeld *et al.*, 2006; Golec 2007). Portanto, o peptídeo antimicrobiano LL-37 parece estar envolvido tanto na resposta imune inata quanto na resposta imune adaptativa.

Diferentes trabalhos têm descrito o papel antimicrobiano de LL-37 sobre periodontopatógenos como Aa (Zasloff 2002; Nørskov-Lauritsen et al., 2006), *F. nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus salivarius* (Ouhara et al., 2005), uma vez que estes microrganismos apresentam reduzida taxa de crescimento quando em contato com LL-37 em condições ótimas de desenvolvimento. Este peptídeo também apresenta ação sinérgica com algumas proteínas e peptídeos da defesa inata do hospedeiro, como a lactoperoxidase, lisozima e  $\alpha$ -defensinas, exercendo atividade microbicida contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Ec) (Nagaoka et al., 2000; Singh et al., 2000; Chen et al., 2005).

Além da produção de LL-37, os neutrófilos são destacados por produzirem constitutivamente abundantes quantidades de  $\alpha$ -defensinas e por esse motivo elas podem ser chamadas peptídeos de neutrófilos humanos (HNP) (Ganz et al., 1985; Ganz et al., 1994; Risso, 2000; Diamond et al., 2008). Tais HNP possuem estrutura de fitas  $\beta$ -pregueadas e são sintetizadas em suas formas precursoras, após serem clivadas por enzimas tornam-se ativadas, para, posteriormente, serem estocadas e liberadas dos grânulos neutrofílicos (Hecht, 1999; Abiko et al., 2003). As HNP são divididas em seis subtipos e as encontradas em grânulos azurófilos dos neutrófilos são as HNP-1, HNP-2, HNP-3 e HNP-4, sendo que as HNP 1-3 correspondem a cerca de 30 a 50% das proteínas totais granulares (Ganz et al., 1985; Zasloff, 2002; Lundy et al., 2005; Davison et al., 2009). HNP-4 é descrita ser a menos abundante em neutrófilos e a apresentar uma menor homologia estrutural com as HNP 1-3 acima citadas (Lehrer, 2004). Os outros dois subtipos, HNP-5 e HNP-6, são identificados principalmente em células intestinais de Paneth (Lundy et al.,

2005; Abiko *et al.*, 2003), bem como em menores concentrações em células B e *natural killer* (NK) (Davison *et al.*, 2009). Tem sido relatado que as HNP-1, -2 e -3 possuem sequências de aminoácidos extremamente semelhantes entre si (Lehrer, 2004, Lundy *et al.*, 2005), diferindo apenas no primeiro aminoácido de cada cadeia. A HNP-1, por exemplo, possui alanina enquanto a HNP-3 possui aspartato, contudo, ambas apresentam uma sequência de 30 aminoácidos (Lehrer, 2004). Já na HNP-2, este primeiro aminoácido está ausente, conseqüentemente sua cadeia é composta por 29 aminoácidos. Além disso, acredita-se que a HNP-2 possa ser oriunda da proteólise de HNP-1, HNP-3 ou de ambas (Lehrer, 2004).

Por outro lado, apesar da homologia nas sequências de aminoácidos, as HNP podem exercer diferentes atividades biológicas. Algumas delas foram comprovadas *in vitro*, por exemplo, a capacidade microbicida exercida pelas HNP-1, -2 e -4 contra levedura *Candida albicans*, por inibirem a síntese de RNA, DNA e proteínas deste fungo (Lehrer *et al.*, 1988, 1989; Wilde *et al.*, 1989), a atividade quimiotática de HNP-1 e -2 para células T e monócitos humanos (Territo *et al.*, 1989; Chertov *et al.*, 1996) e o aumento das respostas imunes dependentes de células T promovido pelas HNP-1, -2 e -3 (Lillard *et al.*, 1999). Em adição, as HNP produzidas por neutrófilos estão envolvidas em diferentes respostas *in vivo*, uma vez que elevados níveis destas defensinas foram encontrados em fluído bronco-alveolar de pacientes com inflamação das vias aéreas (Mukae *et al.*, 2007), no suco gástrico de pacientes portadores de *Helicobacter pylori* e com inflamação estomacal (Isomoto *et al.*, 2004), na saliva e fluído crevicular de pacientes com doenças orais, como periodontite (Puklo *et al.*, 2008; Davison *et al.*, 2009), entre outras.

O mecanismo microbicida das HNP 1-3, assim como na maioria das defensinas, pode ser representado pela capacidade das cadeias de aminoácidos hidrofílicas e hidrofóbicas interagirem diretamente com as membranas lipídicas dos microrganismos. Dessa forma, as HNP acumulam-se na superfície dos patógenos formando uma espécie de “tapete”, a bicamada lipídica é então distendida e peptídeos antimicrobianos penetram-na através de forças eletrostáticas, originando o poro (Lohner *et al.*, 1997; Huang, 2000; Matsuzaki, 2001; Ganz, 2003).

Complementarmente aos mecanismos microbicidas diretos, as HNP são capazes de amplificar suas respostas através de efeitos quimiotáticos para células dendríticas imaturas, células T e mastócitos (De Yang *et al.*, 2000; Grigat *et al.*, 2007). Ainda estimulam a expressão e a síntese de IL-8 por células epiteliais brônquicas humanas (Sakamoto *et al.*, 2005); em concentrações elevadas podem ser citotóxicas para células epiteliais respiratórias (Sakamoto *et al.*, 2005); podem induzir a produção de mucinas por células do trato respiratório, como também podem causar agregação de bactérias e vírus facilitando a captação desses patógenos por neutrófilos e/ou macrófagos (Tecele *et al.*, 2007; Ishimoto *et al.*, 2009; Doss *et al.*, 2010). Dessa maneira, as funções exercidas por LL-37 e por HNP 1-3 contra fungos, vírus envelopados, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Lehrer *et al.*, 1985, 1988; Daher *et al.*, 1986; Wilde *et al.*, 1989; Furci *et al.*, 2007) diminuem a viabilidade destes microrganismos (Ganz, 2003) tanto de forma direta quanto indireta, provavelmente ainda contribuem para o desenvolvimento de ambas as respostas imunes inata e adaptativa.

Todavia, os mecanismos microbicidas dos neutrófilos não ficam limitados à presença dos peptídeos antimicrobianos LL-37 e HNP 1-3. Estas células ainda agem sintetizando uma série de resíduos tóxicos oxidantes que são formados por reações entre os superóxidos produzidos pelas enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo-P (NADPH) oxidase e pela óxido nítrico sintase (NOS), sendo a NOS induzível (iNOS) a maior responsável pela produção constitutiva do NO (Bogdan, 2001; Lehrer, 2004). Assim, os neutrófilos podem potencialmente gerar uma dinâmica mistura de gases, com principalmente NO entres outros como peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila, oxigênio singlete e peroxinitrito (Bogdan, 2001; Lehrer 2004). Está confirmado que o NO é capaz de exercer diferentes papéis biológicos (Bogdan, 2001), variando desde a atividade anti-tumor até a redução da replicação e/ou morte de inúmeros microrganismos como as bactérias, por exemplo.

Periodontopatógenos como Aa, Pg e *F. nucleatum* são capazes de induzir a ativação da enzima iNOS, resultando em maiores níveis desse radical tóxico nos tecidos gengivais bem como sangue do hospedeiro (Miyasaki *et al.*, 1986; Sheikhi *et al.*, 2001; Alayan *et al.*, 2006; Garlet *et al.*, 2008; Guentsch *et al.*, 2009). Embora, a função do NO no desenvolvimento da periodontite ainda permanece sem um consenso, é conhecido que a produção de deste gás exerce importante função protetora contra distintas bactérias nos tecidos orais. Pois, a deficiência de NO, seja pela inibição da iNOS ou pela ausência desta enzima em modelos experimentais, implica em aumento descontrolado de bactérias, intensificando a patogênese periodontal (Miyasaki *et al.*, 1986; Alayan *et al.*, 2006; Garlet *et al.*, 2008). Em contrapartida, alguns trabalhos ainda sugerem que o desenvolvimento da

periodontite esteja relacionado com a intensa resposta inflamatória gerada contra os microrganismos invasores.

Os neutrófilos também são capazes incrementar os mecanismos protetores com produção de variadas citocinas. Isso ocorre quando estas células são estimuladas pela presença de microrganismos ou seus fatores de virulência como LPS. Dentre as citocinas produzidas, podemos citar algumas com efeito pró-inflamatório tais como IL-8, IL-12 e IFN- $\gamma$  (Bazzoni *et al.*, 1991; Cassatella *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2001; Schröder *et al.*, 2006 e Restaino *et al.*, 2007). Individualmente, a IL-8 é classificada como uma das citocinas chave em promover o recrutamento de neutrófilos circulantes para o foco inflamatório. Tal função é facilitada pelo fato desta interferir nos processos de adesão e transmigração dos neutrófilos através das células endoteliais e ainda aumentar a meia-vida dos granulócitos por suprimir a apoptose (Kobayashi 2008). A IL-8 é rapidamente eliminada por neutrófilos, uma vez que já se encontra pré-formada dentro dos grânulos citoplasmáticos destas células. A liberação é induzida quando os polimorfonucleares são estimulados por LPS, LPS associado à IFN- $\gamma$  ou à IL-12 e pelo peptídeo antimicrobiano LL-37 (Ethuin *et al.*, 2001; Kobayashi, 2008; Bucki *et al.*, 2010).

Já a IL-12, produzida, sobretudo por fagócitos como os neutrófilos (Cassatella *et al.*, 1995), ainda estimulam a síntese de IL-8 na presença de LPS, também é descrita aumentar o potencial fagocitário destas células (Trinchieri, 1998; 2003), bem como ser quimiotática para neutrófilos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, intensificando a acumulação destes em tecidos inflamados (Allavena *et al.*, 1994). Entretanto, a IL-12 possui como principal alvo as células NK e os linfócitos B, que respondem através da produção de outra citocina pró-

inflamatória, o IFN- $\gamma$  (Trinchieri, 1998). IL-12 ainda pode induzir aumento nos índices de proliferação de células NK e linfócitos T pré-ativados, além de favorecer a formação de linfócitos T CD8 citotóxicos (Trinchieri, 2003). Ethuin e colaboradores (2004) demonstraram que neutrófilos estimulados com IL-12 passam a sintetizar IFN- $\gamma$  pré-formados e, que tal secreção é altamente potencializada pela ação sinérgica de IL-12 com LPS e outros estímulos como IL-18 ou IL-15. Sugerindo que neutrófilos podem participar tanto da resposta imune inata como da adaptativa, além de possivelmente favorecer um padrão de resposta imune caracterizado Th1, o qual parece ser predominante na imunidade à periodontite.

Finalmente, IFN- $\gamma$  é considerada a principal citocina ativadora da fagocitose, por aumentar o englobamento de microrganismos, estimular a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, por exemplo a própria IL-12, estabelecendo assim um *feedback* positivo entre ambas. Ainda, IFN- $\gamma$  induz síntese de quimiocinas e moléculas microbidas como NO e derivados reativos do oxigênio (Schröder *et al.*, 2004) através da indução da enzima iNOS. De acordo com dados da literatura, IFN- $\gamma$  está presente em elevados níveis no fluído gengival crevicular e tecidos gengivais de indivíduos acometidos pela doença periodontal (Ebersole *et al.*, 2000; Ukai *et al.*, 2001) nos quais ainda pode-se observar rico infiltrado inflamatório, representado por neutrófilos, entre outras células. Garlet e colaboradores (2008) têm demonstrado o papel essencial desta citocina contra o desenvolvimento de bactérias periodontopatogênicas, sugerindo dessa forma, uma relevante participação de IFN- $\gamma$  no controle de infecções microbianas, como as observadas na periodontite.



Sendo assim, os neutrófilos além de serem rapidamente quimioatraídos para o foco inflamatório, ainda são equipados com diferentes mecanismos antimicrobianos, independentes de oxigênio, com síntese e secreção de LL-37 e HNP 1-3 e dependentes de oxigênio, com produção de NO e outros radicais tóxicos durante a fagocitose. Tais eventos ainda são acompanhados pela produção de citocinas que medeiam o desenvolvimento de processos inflamatórios. Enfim, a importância dos neutrófilos no desenvolvimento da periodontite especificamente, tem sido amplamente demonstrada por diversos estudos (Miller *et al.*, 1984; Van Dyke & Hoop, 1990; Del Fabbro *et al.*, 2000; Carlsson *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2007), os quais enfatizam que na ausência destas células há representativo aumento da doença oral. Baseado nestes e em outros dados citados anteriormente, o objetivo de nosso trabalho foi traçar um estudo comparativo entre neutrófilos isolados de voluntários com periodontite e com periodonto saudável após estimulação destas células com LPS de periodontopatógenos com o intuito de verificarmos se ambos os grupos celulares apresentariam diferenças na expressão e produção de LL-37, HNP 1-3, NO e citocinas inflamatórias IL-8, IL-12 e IFN- $\gamma$ , para aumentarmos os conhecimentos sobre a periodontite crônica.

## 2. PROPOSIÇÃO

A hipótese deste estudo era de que a produção dos peptídeos antimicrobianos, citocinas e NO estivessem associados à periodontite e, que LPS de bactérias periodontopatogênicas pudessem afetar a produção destes componentes imunes em neutrófilos. Sendo assim, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Quantificar, pelo método de Real Time-PCR, a expressão de RNAm de LL-37, HNP 1-3 e citocinas IL-8, IL-12 e IFN- $\gamma$  nos neutrófilos isolados de pacientes com periodontite e com o periodonto saudável, após estimulação destas células com LPS de periodontopatógenos.
- Quantificar, pelo método de ELISA, a produção dos peptídeos LL-37 e HNP 1-3, das citocinas IL-8, IL-12 e IFN- $\gamma$  nos sobrenadantes das culturas de neutrófilos de voluntários com periodontite e saudáveis após estimulação celular com LPS de periodontopatógenos.
- Quantificar, pela reação de Griess, a produção de NO nos sobrenadantes de neutrófilos de pacientes com periodontite e com periodonto saudável após cultivo das células com LPS de bactérias periodontopatogênicas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

*Aspectos éticos da pesquisa.* Os voluntários desta pesquisa foram estritamente tratados de acordo com a resolução CNS 196/96 sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição (número do CEP 018/2006) e receberam todas as informações referentes ao estudo. Os voluntários tiveram a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

*Grupo experimental, critérios de inclusão e exclusão.* Todos os voluntários foram examinados clínica e radiograficamente nas clínicas de graduação e especialização da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP. O exame periodontal incluiu profundidade de sondagem, índice de placa, índice gengival e retração gengival. Puderam participar do estudo, indivíduos que não haviam recebido tratamento periodontal nos últimos 6 meses anteriores à pesquisa, voluntários dentados ou parcialmente edêntulos (com pelo menos 14 dentes naturais), com periodontite crônica, segundo Armitage 1999, e com no mínimo 4 dentes contendo bolsas periodontais  $\geq 5$  mm. Foram excluídos do estudo todos os indivíduos que durante o exame clínico e anamnésico apresentaram evidência de fatores modificadores sistêmicos da periodontite como osteoporose tipos I e II, alcoolismo, diabetes, tabagismo, imunossupressão adquirida ou induzida, qualquer alteração hormonal com potencial de modificar o perfil da doença, como gravidez e pacientes submetidos à reposição hormonal. Ainda, foram excluídos voluntários com estresse físico e/ou emocional, usuários de medicamentos como antibióticos e anti-inflamatórios, os quais poderiam influenciar nos resultados finais do trabalho. Para o grupo controle, foram

selecionados voluntários com periodonto saudável, sem nenhum sítio com profundidade de sondagem >5 mm ou perda de inserção >3 mm.

Maiores detalhes sobre os grupos envolvidos na pesquisa são apresentados na tabela abaixo.

<b>GRUPO</b>	<b>SEXO</b>	<b>IDADE MÉDIA</b>
<b>COM PERIODONTITE</b>	3 homens	47,5 anos
	3 mulheres	46,6 anos
<b>SAUDÁVEIS</b>	3 homens	26,3 anos
	3 mulheres	36,4 anos

*Extração e purificação de LPS bacterianos.* Os LPS de Aa e Pg foram gentilmente cedidos pela profa. Dra. Fatiha Chandad do Grupo de Pesquisa em Biologia Bucal (GREB), da Faculdade de Odontologia, Universidade Laval, Québec-Canadá. Brevemente, as extrações foram realizadas de acordo com Westphal & Jann, (1965) e modificado por Stead *et al.* (1975), o tratamento das amostras bacterianas Aa e Pg foi feito com fenol a 45% (p/v) em uma proporção de 10g de bactérias para 100 mL de fenol. A massa bacteriana foi fracionada por agitação intensa, inicialmente por 5 minutos em banho de gelo e depois, durante 15 minutos em banho-maria a 72°C. Posteriormente, a mistura descansou por 15 minutos em banho de gelo e foi centrifugada a 1.000 g por 30 minutos a 4°C. A fase aquosa foi removida e substituída por igual volume de água destilada, e o procedimento repetido por duas vezes para a re-extração do LPS. Ao final desta etapa, obteve-se uma fase aquosa e uma fenólica que foram centrifugadas a 10.000 g por 30 minutos. Os sobrenadantes foram dialisados durante 2 dias contra água destilada a 4°C. Para a precipitação do LPS, o

material foi tratado com acetona (3 vezes o volume) na presença de traços de cloreto de magnésio e deixado em repouso em banho de gelo por 2 horas. Após nova centrifugação a 5.000 g por 10 minutos, os precipitados obtidos foram ressuspensos e dialisados por 12 horas contra tampão Tris Acetato 0,025 M pH 7.5 contendo 0,001 M de cloreto de magnésio e 0,02% de azida sódica. O material foi então tratado com 1 mg de DNase e 15 mg de RNase pancreática bovina durante 18 horas a 37°C sob agitação. Posteriormente, o material foi submetido à centrifugação a 4.000 g por 1 hora e, em seguida, o sobrenadante foi submetido à nova centrifugação a 100.000 g por 4 horas. Ao sedimento formado, foram acrescentados 30 mL de solução de uréia 6 M, homogeneizados e posteriormente submetidos à nova etapa de centrifugação a 100.000 x g por 3 horas. Os sedimentos foram ressuspensos em 3 mL de água destilada e liofilizados.

O LPS de *E. coli* utilizado em nossos experimentos foi obtido da Sigma Chemical Company (USA).

***Isolamento de neutrófilos humanos.*** O sangue periférico (20 mL) de voluntários com periodontite crônica (grupo experimental,  $n = 6$ ) e com o periodonto saudável (grupo controle,  $n = 6$ ) foi coletado na presença de anticoagulante heparina e os neutrófilos foram isolados através de centrifugação por gradiente. Previamente foram adicionados a um tubo tipo falcon 3,0 mL de Histopaque 1119<sup>TM</sup> (Sigma), 4,0 mL de Hitopaque 1083<sup>TM</sup> (Sigma) e por último 6,0 mL do sangue com anticoagulante. Essas amostras foram centrifugadas por 25 minutos à temperatura de 25°C a 460 g. Em seguida, a camada de granulócitos foi coletada e transferida para outro tubo, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS) estéril, o sobrenadante descartado e o *pellet* de células foi ressuspensão em PBS. As

hemácias presentes na amostra foram submetidas à lise por cloreto de amônio 0,2% por 30 segundos. As células foram novamente lavadas com PBS e os neutrófilos foram ressuspensos em meio RPMI 1640 suplementado com 10% soro fetal bovino e antibióticos. A viabilidade e a concentração de neutrófilos no meio foram determinadas por contagem das células coradas com azul de Trypan em microscópio de luz, foram excluídas da contagem todas as células coradas em azul/mortas.

***Fenotipagem dos neutrófilos isolados:*** Para fenotipagem dos neutrófilos humanos isolados do sangue periférico (colaboração da Profa. Dra. Ana Paula Campanelli-Faculdade de Odontologia de Bauru-USP) utilizamos anticorpos anti-CD62L (conjugado com Ficoeritrina (PE)), anti-CD11b (PE), anti-Mac-1 (PE), anti-TLR2 (PE), anti-CD64 (conjugado com Isoticianato de Fluoresceína (FITC)), anti-CXCR1 (FITC) e anti-TLR4 (FITC), e os respectivos isotipos controles (IgG conjugado a PE e FITC) (BD Biosciences-Brasil). A aquisição das células foi feita em aparelho de citometria de fluxo FACSort usando software Cellquest (BD Biosciences-Brasil). Os gráficos e análises foram feitos através do programa FlowJo (Tree Star, Ashland, OR). Após fazer a “gate” na população de granulócitos, os dados correspondentes à FL-2H foram exportados para o histograma usando a opção “Copy Histogram as Text” e a análise estatística desses dados foi realizada através do programa GraphPad Prism.

Brevemente descrevemos a metodologia usada, os neutrófilos foram contados e câmara de Neubauer e cerca de  $1 \times 10^7$  células/mL foram colocadas em cada tubo. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com PBS 20% de soro de coelho por 40 minutos a 4°C, após esse período os respectivos anticorpos marcados com diferentes fluorocromos

foram adicionados às células, as quais foram incubadas por 30 minutos à temperatura de 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e centrifugadas por 10 minutos a 1200 rpm a temperatura de 4°C. Em seguida, foram fixadas com PBS formol 1% e armazenadas a 4°C sob proteção da luz até momento da aquisição no citômetro de fluxo.

***Estimulação de neutrófilos humanos:*** uma concentração de  $1 \times 10^7$  células/mL de neutrófilos isolados do sangue periférico de voluntários com doença periodontal e com periodonto saudável foram estimuladas com 100 ng/mL de LPS de Aa, Pg e Ec durante intervalos de 6 e 12 horas a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Após cada intervalo de incubação, os sobrenadantes foram coletados das culturas e armazenados em -70°C até o momento do uso e o RNA total do *pellet* de neutrófilos foi extraído para quantificação da expressão de RNAm para LL-37, HNP 1-3 e citocinas pró-inflamatórias IL-8, IFN- $\gamma$  e IL-12 através de Real Time-PCR.

***Dosagens dos níveis de citocinas produzidas por neutrófilos humanos:*** as citocinas IL-8, IFN- $\gamma$  e IL-12 foram dosadas nos sobrenadantes das culturas de neutrófilos estimulados ou não com LPS de Aa, Pg e Ec utilizando kit de ELISA da BD Opteia (BD Biosciences, USA) para as respectivas citocinas e seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, 50  $\mu$ L do anticorpo de captura diluído em tampão foram adicionados à placa e esta permaneceu incubada por 18 horas a temperatura de 4°C. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem e as ligações inespecíficas bloqueadas com adição de 100  $\mu$ L da solução de bloqueio, novamente as placas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, os poços foram lavados 2 vezes com tampão de lavagem. Um volume de 50  $\mu$ L da curva com concentrações padrões e o mesmo volume de

amostras foram adicionados aos poços e então as placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Após término da incubação, as placas foram lavadas, 50 µL da solução reveladora, contendo o anticorpo de detecção conjugado à biotina, foram adicionados em cada poço da placa que permaneceu incubada por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas rapidamente e 50 µL do substrato foram adicionados. Após 30 minutos de incubação ao abrigo da luz, a reação colorimétrica foi bloqueada com a adição de 50 µL de solução de “stop” (1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ou 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A absorbância dos substratos foi medida utilizando-se comprimento de onda de 450 nm em aparelho de espectrofotômetro.

*Extração do RNA total de neutrófilos humanos.* Neutrófilos de voluntários saudáveis ou com periodontite crônica foram estimulados com LPSs bacterianos, como descrito anteriormente, tais culturas permaneceram incubadas 6 e 12 horas e tiveram seus RNAs totais extraídos pelo método de TRIzol (Gibco BRL, life Technologies, Rockville, MD, USA). Resumidamente, a extração do RNA total dos neutrófilos foi feita acrescentando-se 1 mL de reagente TRIzol em cada microtubo contendo as células, estes microtubos foram agitados rapidamente e incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, adicionamos 200 µL de clorofórmio (Merck) nos tubos que foram submetidos à agitação mecânica e incubados por mais 10 minutos ainda em temperatura ambiente. Em seguida, estes foram centrifugados a 11.500 rpm por 15 minutos a 4°C. A porção aquosa foi transferida para outros microtubos aos quais foram adicionados 500 µL de isopropanol, agitados, incubados por 10 minutos e posteriormente, centrifugados como descrito acima. O *pellet* de RNA total foi lavado com etanol 75% gelado e seco em



temperatura ambiente. As amostras de RNA foram ressuspensas em 30 µl de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . As concentrações dos RNAs totais foram determinadas pela leitura das densidades ópticas (DO) através de um comprimento de onda de 260 nm multiplicado pelo fator de correção 40, em espectrofotômetro GeneQuant <sup>TM</sup> 1300 (GE Healthcare Life Sciences).

***Eletroforese das amostras de RNA total.*** Para preparo do gel a 1,2% foram necessários 0,42 g de agarose (BioAgency), acrescido de 3 mL de tampão FA 10X (50mM de acetato de sódio, 10 mM de EDTA) e 32 mL de água destilada, que foram aquecidos até dissolução por completo da agarose. Para finalizar, acrescentamos 600 µL de formaldeído (Merck) e 17,5 µL de brometo de etídio, os ingredientes foram homogenizados e colocados no suporte para polimerização do gel. As amostras foram aplicadas juntamente com o tampão de corrida (lowading buffer, Invitrogen, USA) no gel submergido em tampão FA 1X. A corrente aplicada na eletroforese foi de 70 volts por 40 minutos. Após término da eletroforese, o gel foi fotografado no transiluminador (GelLogic 200, Imaging System) sob luz ultra-violeta.

***Tratamento das amostras para eliminação de DNA contaminante.*** O RNA total foi tratado com Turbo DNA free (Ambion, USA) para a eliminação de qualquer resíduo de DNA da amostra, o procedimento foi seguido de acordo com as instruções do fabricante. Como descrito, foram adicionados 0,1 volume de tampão e 1 µL de DNase em cada amostra de RNA total. Os tubos foram agitados delicadamente e incubados por 30 minutos a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, as amostras foram colocadas no gelo e adicionamos 0,1 volume de inativador, posteriormente, foram agitadas delicadamente e mantidas a

temperatura ambiente por 2 minutos. Após este período, foram centrifugadas por 2 minutos a 11.600 rpm, 4°C. O sobrenadante contendo RNA livre de DNA foi coletado e transferido para outro microtubo. Estas amostras foram quantificadas através de leitura das DO no espectrofotômetro, e em seguida, armazenadas em -70°C até momento do uso.

**Transcrição reversa.** Após obtenção das amostras de RNA livre de DNA, 0,5 µg destas foram utilizados para a síntese de DNA complementar (cDNA). Para isto, as reações foram realizadas utilizando-se o kit "first-strand cDNA synthesis" (Roche Diagnostic Co., Indianapolis, IN, USA), seguindo as recomendações do fabricante para um volume final de 20 µL de cDNA. As amostras foram incubadas por 10 minutos a 25°C e então por 60 minutos a 42°C. Concluído o segundo ciclo, as amostras foram incubadas por 5 minutos a 99°C e então por 5 minutos a 4 °C para resfriamento. Os reagentes utilizados e suas respectivas concentrações foram: solução tampão (1x), MgCl<sub>2</sub> (5 mM), mistura de deoxinucleotídeos (1 mM), *primers* randomizados - p[dN]<sub>6</sub> (3,2 µg), inibidor de RNase (50U), e transcriptase reversa – AMV (20U).

Os *primers* para gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (gene de referência, expressão constitutiva), IL-8, IFN-γ e IL-12 (cedidos gentilmente pelo Prof. Dr. Francisco Hunberto Nociti Júnior da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP), LL-37, HNP 1-3, foram desenhados com o auxílio do programa Light Cycler Probes Design Software 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). As sequências gênicas dos *primers*, temperaturas de anelamento e comprimento dos *amplicons* estão representados na tabela 1.

Tabela 1: Sequências gênicas, temperaturas de amplificação e comprimentos dos *amplicons*.

Gene	Sequência (5'-3')	Amplificação (temperatura (°C)/tempo (s))	<i>Amplicon</i> (pares de base-bp)
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC GAAGATGGTGATGGGATTTC	95/0; 51/2; 72/9	226
LL-37	GCTAACCTCTACCGACTCCT TCCTCTGGTGACTGCTGGT	95/10; 59/4; 72/5	131
IL-8	GCCAAGAGAATATCCGAACITTAAT CTGGCTAGCAGACTAGGG	95/0; 55/2; 72/6	172
IL-12	TTCCAGAGAGACCTCTTTCATAACT AAT ATCCATCAGAAGCTTTGCAT	95/10; 55/5; 72/6	150
IFN- $\gamma$	CTGACTAATTATTCGGTAACTGACT TGA AGGCAGGACAACCATTACT	95/0; 55/7; 72/20	164
HNP 1-3	TGCATGGGACGAAAGCTTG CATGTTTTTCCTTGAGCCTGG	95/10; 55/3; 72/6	52

A especificidade dos *primers* foi avaliada através das curvas de Melting (obtidas após ciclos de amplificações no LightCycler) e a integridade dos produtos das amplificações foi observada através da eletroforese destes em gel de agarose. A eficiência das reações para cada *primer* foi padronizada anteriormente ao início das reações propriamente ditas. Concentrações variando de 2 a 5mM de MgCl<sub>2</sub> e de 0,2 a 0,5  $\mu$ M de cada *primer* foram utilizadas para se determinar em quais condições a reação teria melhor eficiência. Essas condições foram sugeridas pelo fabricante do equipamento.

**Reações de Real-time PCR.** As reações de Real Time-PCR foram realizadas com o sistema LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), utilizando-se o kit “*FastStart DNA Master SYBR Green I* (Roche Diagnostic Co.)” (colaboração do Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP).

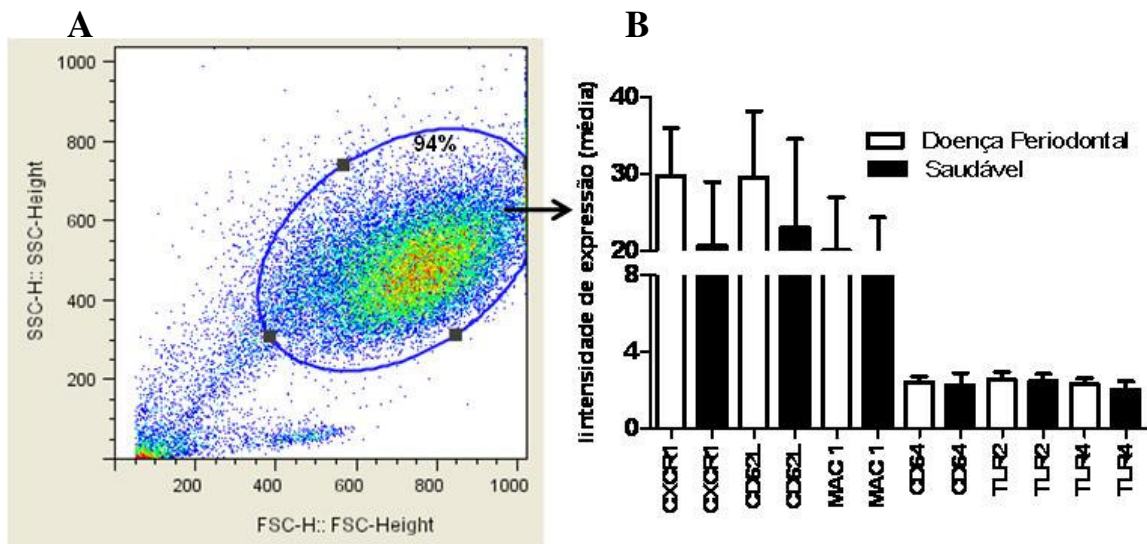
O perfil das reações foi determinado seguindo as recomendações do fabricante do equipamento. Para cada uma das reações de amplificação, a água foi utilizada como controle negativo, e o produto destas reações foi quantificado utilizando-se o programa do próprio fabricante (LightCycler Relative Quantification Software - Roche Diagnostics GmbH). O gene GAPDH foi utilizado como gene de referência para a normalização dos valores obtidos.

*Análise estatística dos resultados.* Os resultados obtidos foram submetidos a uma comparação intergrupo utilizando-se o teste  $t$  (Test  $t$  -  $\alpha=0.05$ ). O nível de diferença estatística significativa foi fixado em  $p \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### **Fenótipo de neutrófilos isolados de pacientes com periodontite crônica e com periodonto saudável**

Após separarmos as células observamos que uma grande maioria permanecia viável e, de acordo com as características morfológicas exibidas, como a presença de núcleo polilobulado, sugerimos que a população isolada era composta quase exclusivamente de neutrófilos (dados não mostrados). Esse dado foi confirmado, por citometria de fluxo e segundo os dados obtidos, 94% das células isoladas do sangue periférico de voluntários com periodontite e com o periodonto saudável correspondiam aos neutrófilos polimorfonucleares (Fig. 1A). A população de neutrófilos presentes dentro da “gate” foi analisada para determinarmos o perfil fenotípico de ambos os grupos de neutrófilos envolvidos no estudo (Fig. 1B). Baseado em nossos resultados, neutrófilos de voluntários com doença periodontal apresentaram uma tendência em expressar maiores níveis de CXCR1, de CD62L e de Mac-1 que os controles, no entanto, nenhuma diferença estatística significativa foi observada quando comparamos os níveis moleculares de ambos os grupos de neutrófilos estudados (Fig. 1B). Por outro lado, a expressão das moléculas de CD64, de TLR2 e de TLR4 foi bastante semelhante entre os neutrófilos de pacientes com periodontite e saudáveis (Fig. 1B).



**Figura 1. Fenotipagem de neutrófilos isolados do sangue periférico humano.** Células polimorfonucleares isoladas por gradiente de centrifugação a partir de sangue periférico de voluntários com periodontite ( $n = 6$ ) e com periodonto saudável ( $n = 6$ ) foram marcadas com anticorpos anti-CXCR1, -CD64 e -TLR4 conjugados com FITC e anti-CD62L, -Mac-1 e -TLR2 conjugados com PE (BD) como descrito em material e métodos. As células foram adquiridas em citômetro de fluxo FACSsort usando software Cellquest (BD). As análises foram feitas através do programa FlowJo (Tree Star, Ashland, OR) e a porcentagem de células polimorfonucleares foi expressa na *gate*. A média das expressões das moléculas de superfícies em estudos está representada no gráfico de barras.

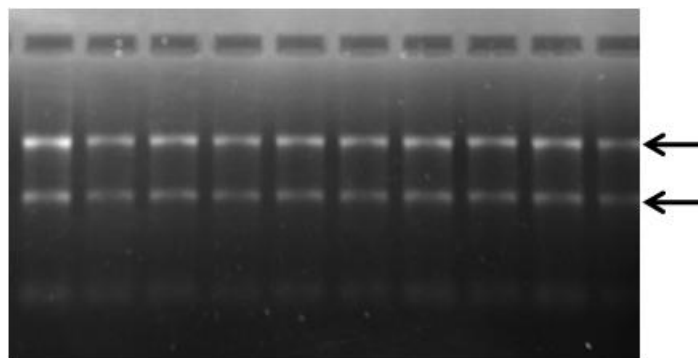
### Determinação da concentração de LPS e tempo de incubação nas culturas de neutrófilos humanos

Após isolamento dos neutrófilos do sangue periférico humano analisamos quais concentrações de LPS de Aa, Pg e Ec poderiam ser utilizados para estimular as culturas sem, portanto, reduzir a viabilidade dos neutrófilos, uma vez que a queda na viabilidade causaria alteração nos níveis de expressão do RNAm para os genes em estudo. Logo, as concentrações de LPS testadas nas culturas primárias de neutrófilos foram 1.000, 100, 10, 5

e 1 ng/mL nos tempos de 1, 12 e 24 horas de estímulo (dados não mostrados). Após cada período de incubação, amostras de neutrófilos foram coletadas das culturas e a viabilidade foi analisada por coloração com azul de Trypan. Baseado em nossos dados e em trabalhos da literatura, as concentrações de LPS de Aa, Pg e Ec que menos interferiram na viabilidade as células foi de 100 ng/mL e os tempos de incubação selecionados foram de 6 e 12 horas para todos os demais experimentos realizados durante o trabalho.

### **Extração e transcrição de RNA total de neutrófilos de voluntários com doença periodontal e com periodonto saudável**

Posteriormente, avaliamos se os RNAs extraídos dos neutrófilos encontravam-se íntegros. De acordo com nossos resultados, observamos a presença das bandas 28S e 18S referentes aos fragmentos de RNA ribossômicos presentes em células eucarióticas (Fig. 2), demonstrando a integridade do material genético extraído. Em seguida, analisamos a expressão gênica dos peptídeos antimicrobianos LL-37 e HNP 1-3 e das citocinas pró-inflamatórias IL-8, IL-12 e IFN- $\gamma$  por Real Time-PCR.

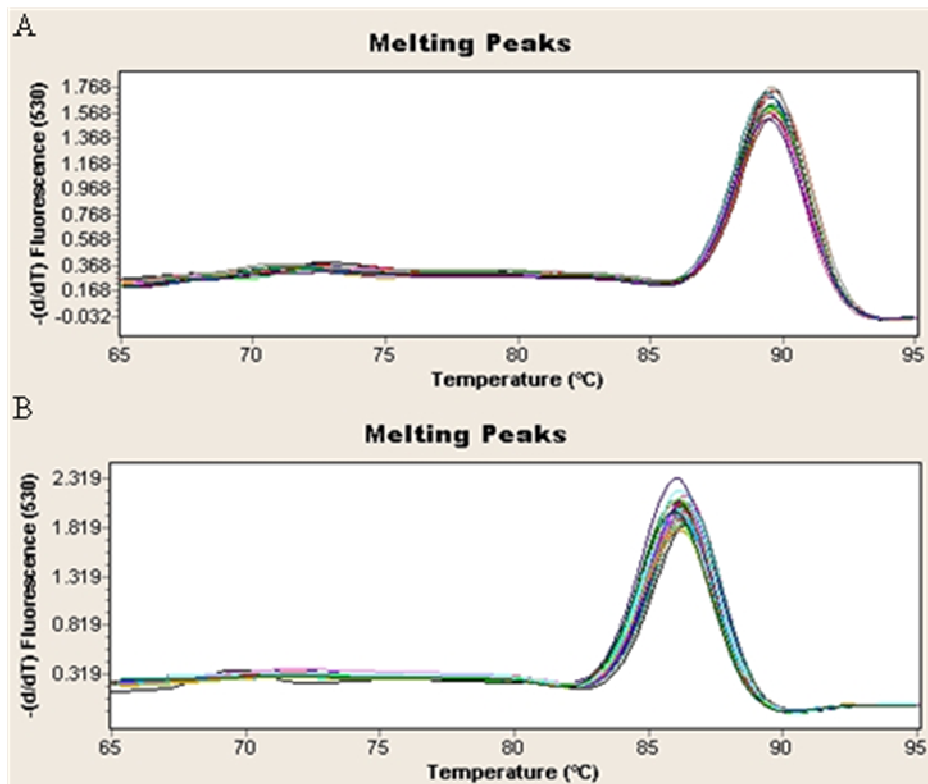


**Figura 2. Análise da integridade do RNA total extraído de neutrófilos de indivíduos com periodontite e saudáveis.** Os neutrófilos isolados de voluntários com periodontite e com o periodonto saudável foram cultivados na presença e ausência de LPS de Aa, Pg e Ec por 6 e 12 horas. Em seguida, o RNA total foi extraído e 0,5 µg/mL dessas amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,2%. As setas apontam as bandas com peso molecular referentes às porções 28S e 18S dos RNAs ribossômicos eucarióticos. Essa figura é representativa das demais análises realizadas para as outras amostras envolvidas nesse estudo.

### **Expressão de LL-37 e de HNP 1-3 em neutrófilos estimulados com LPS de periodontopatógenos e Ec**

Antes de avaliarmos a expressão dos genes da catelicidina LL-37 e das defensinas HNP 1-3, os quais foram normalizados pela expressão do gene GAPDH, testamos a especificidade dos respectivos *primers* (Fig. 3). Como demonstrado, tanto o *primer* para LL-37 (Fig. 3A) quanto o *primer* para GAPDH (Fig. 3B) apresentaram elevada especificidade de reação, fato que possibilitou o prosseguimento das demais análises. Assim como os *primers* para LL-37 e GAPDH, os outros fragmentos utilizados no decorrer do estudo também foram testados quanto às suas especificidades e resultados semelhantes a estes também foram obtidos (dados não mostrados).

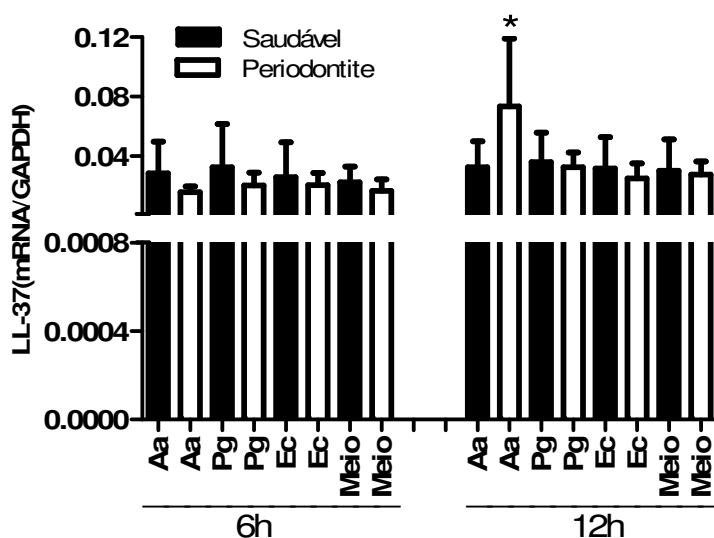




**Figura 3. Expressão de LL-37 e GAPDH por neutrófilos estimulados com LPS de bactérias periodontopatogênicas e *Ec*.** Representação gráfica dos picos das curvas de desnaturação (“melting curve-peaks”) das amostras de cDNA extraídos de neutrófilos estimulados com os LPSs por 6 e 12 horas, ilustrando a especificidade dos *primers* para LL-37 (A) e para GAPDH (B). Os gráficos representam os demais testes obtidos com os outros *primers* utilizados no decorrer do trabalho.

Posteriormente, analisamos a expressão gênica de LL-37 (Fig. 4). De acordo com nossos resultados, os níveis de expressão desta catelicidina foram bastante semelhantes entre os neutrófilos de pacientes com periodontite e de voluntários saudáveis, independente da presença de LPS nas culturas por 6 horas (Fig. 4). Porém, após 12 horas de cultivo observamos que neutrófilos de pacientes com periodontite estimulados com LPS de *Aa* passaram a expressar maiores índices do gene do peptídeo antimicrobiano LL-37 quando

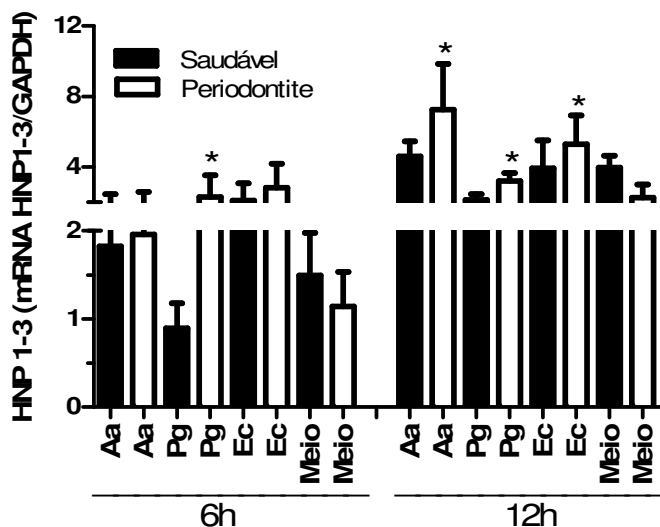
comparado ao controle saudável (Fig. 4). Por outro lado, nenhuma outra diferença na expressão gênica da catelicidina foi constatada nas demais culturas estudadas.



**Figura 4. Expressão de LL-37 em neutrófilos estimulados com LPS.** A intensidade de expressão de LL-37 em neutrófilos isolados do sangue periférico de voluntários com periodontite e saudáveis foi avaliada por Real Time-PCR. As células foram cultivadas na presença ou ausência de 100ng/mL de LPS de Aa, Pg e Ec por 6 a 12 horas. O gene de referência utilizado para normalização dos resultados foi o GAPDH. Cada experimento teve  $n = 6$ ; \* representa diferença estatística com  $p \leq 0,05$  em comparação ao grupo controle (periodonto saudável).

Do mesmo modo, quantificamos a expressão da defensina HNP 1-3 nos neutrófilos de ambos os grupos de voluntários. Nossos dados demonstram que LPS Pg foi capaz de induzir expressão gênica significativamente maior de HNP 1-3 em neutrófilos de pacientes com periodontite no período de 6 horas de incubação quando comparado aos saudáveis (Fig. 5). Tal diferença significativa se manteve até o período de 12 horas de cultivo e, nesse mesmo intervalo de tempo, os neutrófilos de pacientes periodontais estimulados com LPS

de Aa e Ec também apresentaram níveis notadamente elevados na expressão desta defensina quando comparados aos controles (Fig. 5).

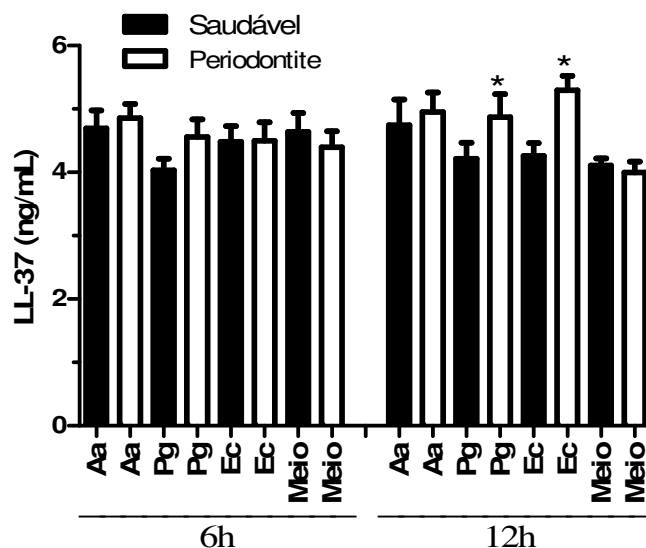


**Figura 5. Expressão de HNP 1-3 em neutrófilos estimulados com LPS.** A intensidade de expressão de HNP 1-3 em neutrófilos isolados do sangue periférico de voluntários com periodontite e saudáveis foi avaliada por Real Time-PCR. As células foram cultivadas na presença ou ausência de 100ng/mL de LPS de Aa, Pg e Ec por 6 a 12 horas. O gene de referência utilizado para normalização dos resultados foi o GAPDH. Cada experimento teve  $n = 6$ ; \* representa diferença estatística com  $p \leq 0,05$  em comparação ao grupo controle (periodonto saudável).

### **Produção de LL-37 e HNP 1-3 por neutrófilos estimulados com LPS de periodontopatógenos e Ec**

Segundo nossos resultados, tanto neutrófilos de pacientes com periodontite quanto neutrófilos de voluntários com periodonto saudável, cultivados por 6 horas na presença ou ausência de LPS, apresentaram níveis de produção de LL-37 bastante semelhantes entre si (Fig. 6), portanto nenhuma diferença estatística significativa foi observada entre os grupos neste período de tempo. Por outro lado, as células de pacientes com periodontite que foram

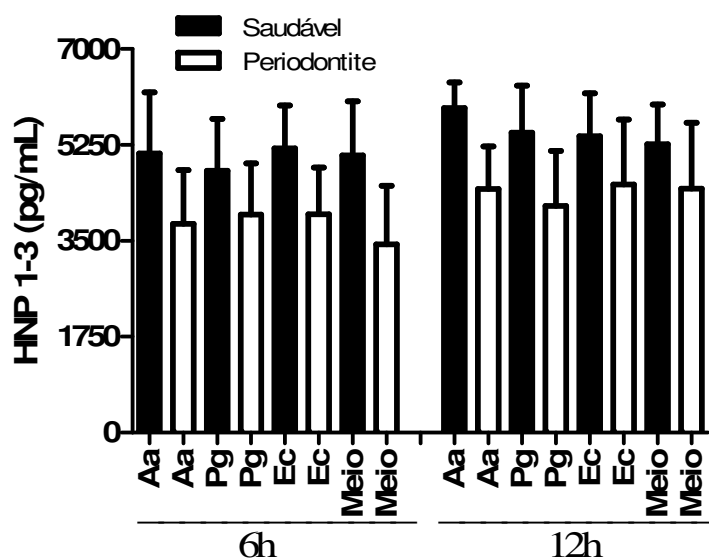
cultivadas por 12 horas com LPS de Pg e de Ec foram capazes de secretar maiores concentrações de catelicidina LL-37 no sobrenadante das culturas em comparação aos neutrófilos de indivíduos saudáveis cultivados nas mesmas condições (Fig. 6). Contudo, nenhuma diferença expressiva foi observada na produção de LL-37 quando avaliamos os demais neutrófilos estimulados com LPS de Aa ou cultivados na ausência de estímulo (Fig. 6).



**Figura 6. Produção de LL-37 por neutrófilos estimulados com LPS.** A produção de LL-37 por neutrófilos do sangue periférico de voluntários com periodontite e saudáveis foi dosada por ELISA. As células foram cultivadas na presença e ausência de 100 ng/mL de LPS de Aa, Pg e Ec por 6 e 12 horas. Cada experimento teve  $n = 6$ ; \* representa diferença estatística com  $p \leq 0,05$  em comparação ao grupo controle (periodonto saudável).

Por outro lado, quando avaliamos a produção de HNP 1-3 observamos que neutrófilos de voluntários com periodonto saudável apresentavam uma tendência em produzir maiores concentrações desta defensina em comparação às células de indivíduos

com periodontite (Fig. 7). No entanto, nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada entre ambos os grupos, tanto no período inicial do estudo, 6 horas de incubação, quanto após 12 horas de cultivo, independente da presença ou ausência de estímulo com LPS Aa, Pg e Ec (Fig. 7).



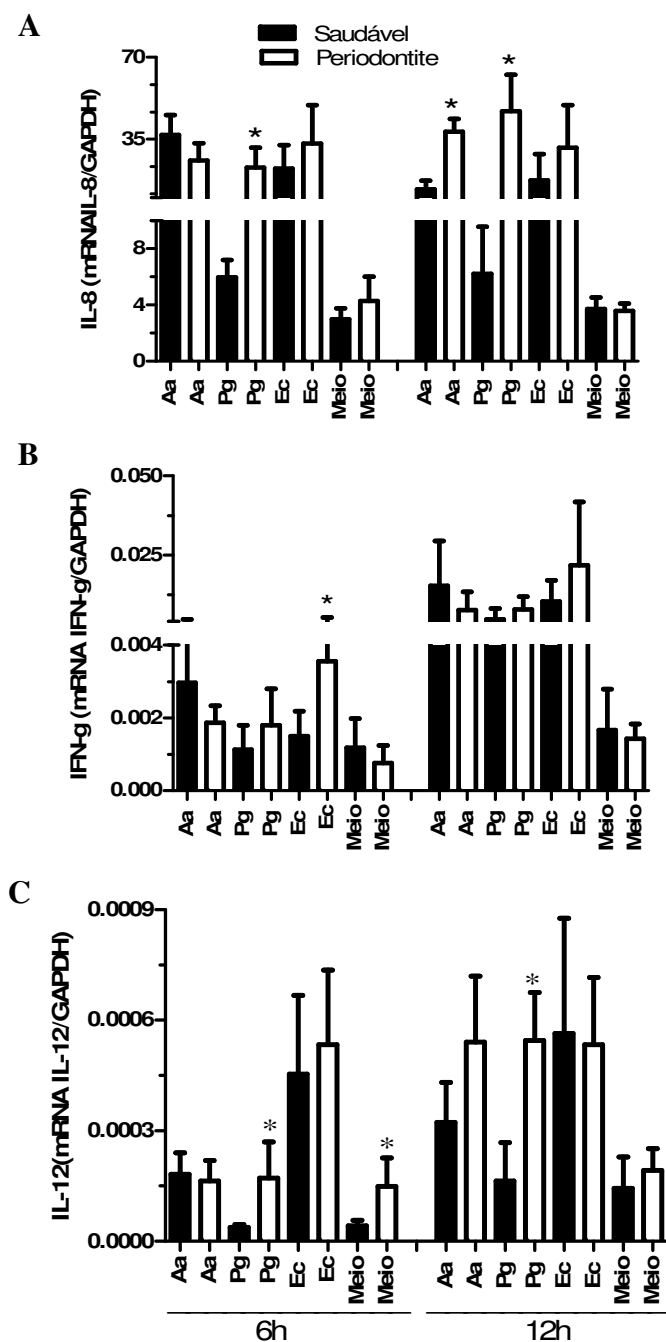
**Figura 7. Produção de HNP 1-3 por neutrófilos estimulados com LPS.** A produção de HNP 1-3 por neutrófilos do sangue periférico de voluntários com periodontite e saudáveis foi dosada por ELISA. As células foram cultivadas na presença e ausência de 100 ng/mL de LPS de Aa, Pg e Ec por 6 e 12 horas. Cada experimento teve  $n = 6$ ; \* representa diferença estatística com  $p \leq 0,05$  em comparação ao grupo controle (periodonto saudável).

### Expressão gênica de IL-8, IFN- $\gamma$ e IL-12 por neutrófilos estimulados com LPS

Além dos peptídeos antimicrobianos LL-37 e HNP 1-3, também avaliamos a expressão de citocinas nos neutrófilos de voluntários com periodontite e com o periodonto saudável (Fig. 8). Como demonstrado, a expressão gênica de IL-8 foi significativamente maior apenas nos neutrófilos oriundos de voluntários com periodontite estimulados com

LPS de Pg no período de 6 horas. Esta diferença manteve-se expressiva até o período de 12 horas de incubação e neste mesmo intervalo de tempo, observamos que LPS de Aa também foi capaz de induzir níveis significativamente elevados na expressão do gene de IL-8 nos neutrófilos de pacientes periodontais em relação aos saudáveis (Fig. 8A). Contudo, resultados semelhantes na expressão desta citocina foram observados nas demais culturas de células estimuladas ou não com LPS (Fig.8A).

Neutrófilos de pacientes com periodontite, após serem cultivados na presença de LPS de Ec por 6 horas expressaram níveis aumentados do gene IFN- $\gamma$  em comparação às células de voluntários com periodonto saudável (Fig. 8B). Todavia, níveis de expressão bastante semelhantes foram induzidos nos neutrófilos de pacientes com periodontite e com periodonto saudável quando estimulados ou não com LPS de periodontopatogenos e Ec por 12 horas (Fig. 8B). Por fim, quantificamos o gene IL-12 e constatamos que as células de pacientes com periodontite estimuladas com LPS de Pg por 6 horas, bem como os mesmos neutrófilos cultivados na ausência de estímulo apresentaram índices maiores de expressão da citocina IL-12 em comparação aos controles (Fig. 8C). Contudo, após 12 horas de incubação, apenas as culturas estimuladas com LPS de Pg mantiveram níveis expressivos do gene IL-12. Os demais neutrófilos cultivados na presença ou ausência de LPS de Aa e Ec não induziram níveis significativos na expressão desta citocina em comparação aos saudáveis (Fig. 8C).



**Figura 8. Expressão de citocinas em neutrófilos estimulados com LPS.** A intensidade de expressão de (A) IL-8, (B) IFN- $\gamma$  e (C) IL-12 em neutrófilos isolados do sangue periférico de voluntários com periodontite e saudáveis foi avaliada por Real Time-PCR. As células foram cultivadas na presença ou ausência de 100ng/mL de LPS de Aa, Pg e Ec por 6 a 12 horas. O gene de referência utilizado para normalização dos resultados foi o GAPDH. Cada experimento teve  $n = 6$ ; \* representa diferença estatística com  $p \leq 0,05$  em comparação ao grupo controle (periodonto saudável).

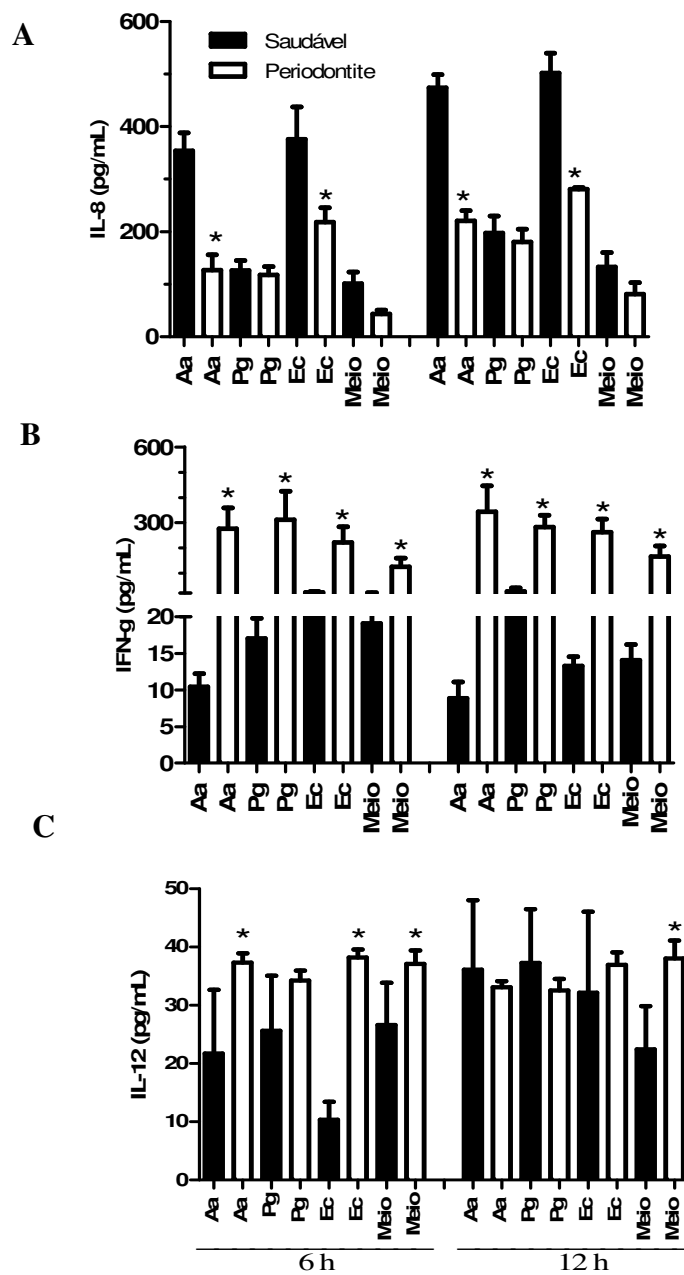
## **Produção das citocinas IL-8, IFN- $\gamma$ e IL-12 por neutrófilos estimulados com LPS**

Baseado em nossos dados, neutrófilos de pacientes com periodontite apresentaram baixos níveis de produção de IL-8 quando comparados com os controles saudáveis, independente da presença ou ausência dos estímulos com LPS bacterianos (Fig. 9A). Mais especificamente, uma redução significativa na produção de IL-8 foi notada no sobrenadante de neutrófilos de pacientes com periodontite cultivados na ausência de estímulos, bem como na presença de LPS de Aa e Ec no período de 6 horas de incubação (Fig. 9A). Os neutrófilos de pacientes doentes que foram estimulados com LPS de Aa e Ec por 12 horas também mantiveram níveis de IL-8 evidentemente menores que os controles. Entretanto, nenhuma outra diferença significativa foi observada entre as demais culturas estimuladas com LPS de Pg e cultivados na ausência de estímulos (Fig. 9A). Contudo, ao avaliarmos a produção de IFN- $\gamma$  observamos que, neutrófilos de pacientes com periodontite produziram concentrações significativamente elevadas desta citocina em ambos os períodos de tempo analisados, tanto na presença como na ausência de LPS de bactérias periodontopatogênicas e Ec (Fig. 9B).

Finalmente, ao quantificarmos a produção de IL-12 observamos que neutrófilos oriundos de indivíduos com periodontite, que foram cultivados na ausência e na presença de LPS de Aa e Ec, produziram aumentadas concentrações desta citocina após 6 horas de incubação (Fig. 9C). Porém, neste mesmo período de tempo, LPS de Pg induziu concentrações semelhantes de IL-12 em ambos os neutrófilos isolados de indivíduos com e sem periodontite. Posterior às 12 horas de incubação, as células de pacientes doentes



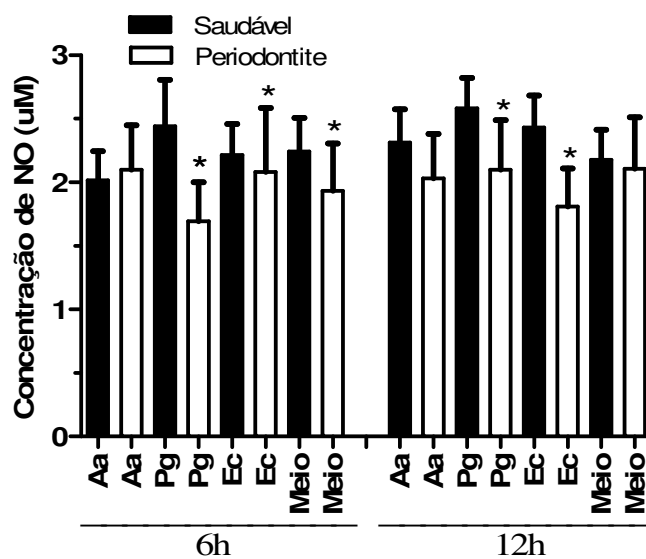
cultivados na ausência de LPS, ainda foram capazes de produzir altas concentrações de IL-12 quando comparados aos saudáveis (Fig. 9C). Neste mesmo período de tempo, a presença de LPS de Aa, Pg e Ec não foi capaz de induzir produção expressivamente diferenciada desta citocina entre os neutrófilos isolados de ambos os grupos de voluntários (Fig. 9C).



**Figura 9. Produção de citocinas por neutrófilos estimulados com LPS.** A produção de (A) IL-8, (B) IFN- $\gamma$  e (C) IL-12 por neutrófilos do sangue periférico de voluntários com periodontite e saudáveis foi dosada por ELISA. As células foram cultivadas na presença e ausência de 100 ng/mL de LPS de Aa, Pg e Ec por 6 e 12 horas. Cada experimento teve  $n = 6$ ; \* representa diferença estatística com  $p \leq 0,05$  em comparação ao grupo controle (periodonto saudável).

## **Produção de NO por neutrófilos estimulados com LPS de periodontopatógenos e Ec**

Nossos resultados demonstram que neutrófilos de pacientes com periodontite que foram cultivados na presença de LPS de Pg e Ec, bem como os cultivados na ausência de estímulos de LPS por 6 horas, produziram concentrações expressivamente menores de NO quando comparados aos saudáveis (Fig. 10). Os reduzidos níveis de NO quantificados nas culturas celulares que foram incubadas na presença de LPS de Pg e Ec foram mantidos até o período de 12 horas de cultivo. Por outro lado, concentrações semelhantes deste gás foram produzidas pelos neutrófilos de pacientes com periodontite e com o periodonto saudável após serem estimulados com LPS de Aa e pelas mesmas células cultivadas somente com meio de cultura (Fig. 10).



**Figura 10. Produção de NO por neutrófilos estimulados com LPS.** Os neutrófilos isolados do sangue periférico de voluntários com periodontite e saudáveis foram cultivados na presença e ausência de 100 ng/mL de LPS de Aa, Pg e Ec por 6 e 12 horas. A concentração de NO nos sobrenadantes das culturas foi quantificada através da reação de Griess. Cada experimento teve  $n = 6$ ; \* representa diferença estatística com  $p \leq 0,05$  em comparação ao grupo controle (periodonto saudável)

## 6. DISCUSSÃO

A presença de distintas espécies bacterianas como Aa e Pg no biofilme dental e as condições imunológicas do hospedeiro podem ser fatores decisivos para o desenvolvimento da periodontite. Diversos estudos têm demonstrado o envolvimento das bactérias periodontopatogênicas Aa e Pg na ativação sistêmica de neutrófilos e outras células inflamatórias (Madianos *et al.*, 1997; Restaino *et al.*, 2007, Oscarsson *et al.*, 2008). Tais bactérias são capazes de liberar fatores solúveis como LPS, lipoproteína associada à peptidoglicano (PAL) e proteína chaperona GroEL, entre outros, na corrente sanguínea. Estes produtos solúveis promovem o recrutamento de neutrófilos e agragação plaquetária nos tecidos do hospedeiro, além de induzir maior produção e liberação de metaloproteinase (MMP) 9 e citocinas, os quais estão envolvidos na perpetuação da resposta inflamatória como a observada na periodontite crônica (Madianos *et al.*, 1997; Restaino *et al.*, 2007, Oscarsson *et al.*, 2008).

Os neutrófilos são abundantemente encontrados nas bolsas periodontais, fato que se deve à capacidade destas células serem rapidamente quimioatraídas para o foco inflamatório. Por esse motivo, podem iniciar a resposta contra patógenos invasores através do englobamento e destruição dos mesmos. Estas células são equipadas com mecanismos microbicidas conhecidos como oxidativos, no qual há destacada produção de NO, e mecanismos não-oxidativos, representados pela presença de peptídeos antimicrobianos, como LL-37 e HNP 1-3. O importante papel dos neutrófilos na doença periodontal tem sido

ênfatisado por diversos trabalhos da literatura (Miller *et al.*, 1984; Van Dyke & Hoop 1990; Carlsson *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2007). Estes descrevem que indivíduos neutropênicos ou com anormalidades funcionais em neutrófilos apresentam uma maior predisposição ao desenvolvimento de exacerbada periodontite.

No entanto, ainda não está bem estabelecido se neutrófilos de indivíduos com periodontite apresentam diferenças funcionais em resposta a estímulos de LPS de periodontopatógenos quando comparados aos neutrófilos de indivíduos saudáveis, no que se refere à produção de substâncias como peptídeos antimicrobianos, NO e citocinas pró-inflamatórias. Com base nestes dados, para avaliarmos a produção deste arsenal microbicida isolamos amostras celulares altamente purificadas do sangue periférico dos voluntários com periodontite e saudáveis. Das células obtidas, 94% correspondiam aos neutrófilos, fato que validou a técnica de isolamento celular, assegurando que as células utilizadas no decorrer dos experimentos representavam a população de interesse.

Em seguida, as características fenotípicas destas células foram estudadas. No entanto, de acordo com nossos resultados, tanto os neutrófilos de voluntários com periodontite quanto os neutrófilos de voluntários saudáveis apresentaram níveis semelhantes na expressão de todas as moléculas de superfície pesquisadas. Contudo, os elevados níveis de CXCR1 e Mac-1 observados em ambos os grupos de neutrófilos sugerem tais células possuem capacidade semelhante de serem quimiotaticamente atraídas para o foco inflamatório. As moléculas CD62L também foram expressas em altos níveis em ambos os grupos de células, indicando ausência de ativação dos neutrófilos até a etapa

anterior à cultura, eliminando qualquer hipótese de pré-ativação celular. Estes dados podem ser reforçados por trabalhos que demonstram haver uma rápida redução nos números de CD62L após ativação de neutrófilos com diferentes estímulos, como LPS, IL-1, leucotrieno B4, entre outros (Suri *et al.*, 2008; Vega *et al.*, 2010).

Adicionalmente, os níveis de CD64 observados nas células isoladas reforçam a hipótese de que os neutrófilos não sofreram ativação antes do cultivo com LPS. Estes dados corroboram com resultados descritos na literatura que demonstram uma baixa expressão destas moléculas nas populações de neutrófilos em repouso, os quais em apenas poucas horas após receberem estímulos bacterianos passam a expressar níveis elevados de CD64 (Davis, 2005; Lam & Ng, 2008; Cid, *et al.*, 2010).

Os neutrófilos ainda são capazes de expressar moléculas de TLR em suas superfícies e, segundo Parker e colaboradores (2005), estas células possuem RNAm para todos os TLR, exceto para TLR3. No entanto, o número das moléculas TLR, especificamente TLR1, TLR2, TLR4 e TLR9 em neutrófilos recém-isolados do sangue periférico humano, na ausência de estímulos, é consideravelmente reduzido (Parker *et al.*, 2005). Apoiando estes dados, demonstramos que neutrófilos de ambos os grupos de voluntários apresentaram uma baixa expressão de TLR2 e TLR4. A presença destas moléculas de TLR nas superfícies de neutrófilos torna-se intensificada após estimulação celular por diferentes citocinas e pelos respectivos agonistas de TLR (Parker *et al.*, 2005).

TLR4 juntamente com moléculas de CD14 são essenciais na resposta contra bactérias Gram-negativas, pois funcionam como receptor de LPS transmitindo sinais estimulatórios para células da resposta imune inata como neutrófilos. No entanto, TLR2

também pode agir como receptor para moléculas de LPS como o LPS de Pg. Esta bactéria periodontopatogênica, devido às múltiplas espécies de lipídeo A, induz ativação de resposta ligando simultaneamente em TLR4 e TLR2 e, conseqüentemente, promovendo uma resposta diferenciada em comparação aos patógenos que apenas são reconhecidos por TLR4 (Hirschfeld *et al.*, 2001; Coats *et al.*, 2003; Hajishengallis *et al.*, 2006). Com base nestes dados, justificam-se as distintas produções de citocinas, peptídeos antimicrobianos e NO observadas na resposta de neutrófilos contra os periodontopatógenos Aa e Pg.

Após cultivarmos neutrófilos de voluntários com periodontite e com periodonto saudável observamos que LPS de Aa induziu maior expressão de LL-37 e HNP 1-3, LPS de Pg e Ec promoveram aumento de RNAm de HNP 1-3 em células de pacientes com periodontite. Tais resultados nos permitem sugerir que neutrófilos de pacientes com periodontite respondem com maior intensidade aos diferentes estímulos de LPS bacterianos que os neutrófilos de voluntários saudáveis.

No entanto, investigando-se melhor as respostas de neutrófilos estimulados ou não com LPS observamos que células de voluntários com periodontite estimulados com LPS de Pg e Ec foram capazes de produzir maiores concentrações da catelicidina LL-37 que os controles saudáveis. Estes dados são constatados por outros diversos estudos (Türkoglu *et al.*, 2009) que descrevem aumentada produção desta catelicidina em fluído gengival crevicular, em tecido gengival de indivíduos acometidos pela periodontite (Hosokawa *et al.*, 2006) e em células epiteliais gengivais estimuladas, *in vitro*, por bactérias periodontopatogênicas (Ji *et al.*, 2008). Além da periodontite, está descrito que outras doenças de origem bacteriana como tuberculose e fasciite necrosante, também são capazes



de induzir elevados níveis deste peptídeo por diferentes tipos celulares, especialmente por neutrófilos (Rivas-Santiago *et al.*, 2008; Johansson *et al.*, 2008).

Por outro lado, a produção de HNP 1-3 nos sobrenadantes das culturas de neutrófilos não apresentou correlação com a presença de periodontite, uma vez que níveis semelhantes destas defensinas foram quantificados em neutrófilos de ambos os grupos de voluntários estudados. Resultados semelhantes aos nossos foram publicados por Lundy e colaboradores (2005), os quais descrevem que as concentrações das HNP 1-3 podem ser bastante similares no fluído gengival crevicular de indivíduos com doença periodontal e com periodonto saudável. Em contrapartida, outro trabalho (Puklo *et al.*, 2008) tem evidenciado que apesar de HNP 1-3 ter sido detectada em amostras de fluído gengival crevicular de todos os indivíduos com e sem doença periodontal, houve uma diferença significativa entre estes valores. Neste caso, maiores concentrações de HNP 1-3 foram encontradas em amostras de pacientes com periodontite. Adicionalmente, Isomoto e colaboradores (2004), ao realizarem um estudo sobre inflamação estomacal, demonstraram haver um aumento de HNP no suco gástrico de indivíduos com gastrite causada por *Helicobacter pylori*, contudo ao quantificarem estes peptídeos fora do local inflamatório, no soro destes pacientes, nenhuma diferença significativa foi observada, enfatizando a influência da origem da amostra na detecção destas  $\alpha$ -defensinas. Ainda, vale ressaltar que nenhum dos trabalhos acima citados avaliou a produção *in vitro* de HNP 1-3 por neutrófilos circulantes de indivíduos acometidos ou não pela periodontite, após estimulação destas células com LPS de periodontopatógenos. Sendo assim, sugerimos que estes resultados controversos podem ser devido às diferentes metodologias utilizadas na detecção destes

peptídeos antimicrobianos, bem como na origem das amostras utilizadas para as quantificações dos mesmos. Entretanto, acreditamos que novos estudos poderão ser realizados utilizando neutrófilos isolados do tecido gengival inflamado e posteriormente mantidos em cultura na presença dos diferentes LPS para que resultados mais precisos forneçam maiores esclarecimentos da participação de HNP 1-3 na periodontite.

Está bem elucidado que neutrófilos ativados, além de serem fontes produtoras de peptídeos antimicrobianos, também são capazes de produzir diferentes tipos de citocinas como IL-8, IL-12 e IFN- $\gamma$  (Cassatella *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2001; Ethuin *et al.*, 2001; Restáino *et al.*, 2007). Dessa forma observamos que neutrófilos de pacientes com periodontite, após estimulação com LPS dos periodontopatógenos e Ec também passaram a expressar níveis gênicos mais intensos das citocinas pró-inflamatórias. Especificamente, LPS de Pg, seguido pelo LPS de Aa, foi capaz de induzir maior aumento em RNAm de IL-8 em comparação aos controles, confirmando dados da literatura (Yoshimura *et al.*, 1997; Sugita *et al.*, 1998; Restáino *et al.*, 2007). Ainda, neutrófilos de pacientes com periodontite expressaram níveis mais intensos de RNAm de IFN- $\gamma$ , quando estimulados com LPS de Ec, e do gene IL-12, após cultivo com LPS e Pg. Com base nestas informações, concluí-se que neutrófilos isolados de voluntários com periodontite são mais responsivos que neutrófilos de indivíduos saudáveis. Estes resultados são apoiados por trabalhos (Loos *et al.*, 2000; Kowolik *et al.*, 2001; Matthews *et al.*, 2007) que descrevem haver uma hiper-reatividade nos neutrófilos de pacientes com periodontite em comparação com os mesmos tipos celulares oriundos de indivíduos com gengivite, bem como de indivíduos com periodonto

saudável, e estes ainda ressaltam um aumento no número de neutrófilos circulantes na população acometida pela doença oral.

Quantificando-se a produção das citocinas constatamos que INF- $\gamma$  e IL-12 encontravam-se em maiores concentrações nos sobrenadantes dos neutrófilos de voluntários com periodontite em comparação aos saudáveis. Tais informações são apoiadas em diferentes estudos (Cassatella *et al.*, 1995; Tsai *et al.*, 2005; Yücel *et al.*, 2008; Honda *et al.*, 2008) que demonstram elevados níveis de IL-12 em fluido crevicular gengival, em neutrófilos do sangue periférico e em macerado de tecido gengival de indivíduos acometidos pela periodontite. Nossos dados, em conjunto com estes trabalhos, sugerem seguramente que a IL-12 esteja relacionada com o desenvolvimento da periodontite, visto que esta citocina é conhecida por exercer um papel relevante em outras diferentes doenças inflamatórias, como esclerose múltipla, artrite reumatóide e psoríases (Comabella *et al.*, 1998, Yawalkar *et al.*, 1998, Kim *et al.* 2000; Yücel *et al.*, 2008). IL-12 ainda é capaz de aumentar as funções fagocíticas de neutrófilos e macrófagos interligando ambas as respostas imunes inata e adaptativa (Trinchieri, 1998). Adicionalmente, está bem esclarecido que IL-12 é capaz de induzir a geração de células T auxiliares tipo 1 (Th1), as quais são produtoras de diversas citocinas com atividade pró-inflamatória, dentre elas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e a própria IL-12 (Street *et al.*, 1991; Seder *et al.*, 1993; Stashenko *et al.*, 2007), estabelecendo-se assim um efeito de *feedback* positivo entre a produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  (Cassatella *et al.*, 1995; Tsai *et al.*, 2005).

Corroborando com trabalhos já publicados, observamos que além dos elevados níveis de IL-12, maiores concentrações de IFN- $\gamma$  também foram quantificadas nas culturas

celulares de pacientes com periodontite estimuladas ou não com os LPS de Aa, Pg e Ec em ambos os períodos de tempo analisados. Estes dados são reforçados por diferentes grupos de pesquisadores que relatam presença de elevados níveis de IFN- $\gamma$  em células estimuladas ou não com bactérias periodontopatogênicas, em fluído crevicular gengival e em macerado de biópsias de tecido gengival de indivíduos com periodontite (Nakajima *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2000; Ukai *et al.*, 2001; Górska *et al.*, 2003). Baseado na notória presença desta citocina em tecidos e em células de indivíduos com periodontite, podemos sugerir que IFN- $\gamma$  pode exercer funções significativas durante a resposta iniciada nesta doença oral.

O papel protetor de IFN- $\gamma$  na periodontite foi mais bem estudado por Garlet e colaboradores (2008), os quais descrevem que camundongos geneticamente deficientes desta citocina, apesar de apresentarem reduzida resposta inflamatória local, acompanhada por pequeno número de neutrófilos e de mediadores inflamatórios, o que reduziria a intensidade da doença, apresentaram disseminação de periodontopatógenos por órgãos vitais como coração, pulmões, rins e fígado, além de intestinos. Observou-se ainda que a ausência de IFN- $\gamma$  foi responsável pela redução no ganho de peso e elevada mortalidade destes animais infectados com periodontopatógenos (Garlet *et al.*, 2008), demonstrando que a presença desta citocina tem papel importante na resposta à periodontite.

Contudo, a função desempenhada por IFN- $\gamma$  na resposta imune é amplamente estudada e alguns trabalhos apresentam informações sobre a dupla ação desta citocina no desenvolvimento da resposta inflamatória. Dessa maneira, IFN- $\gamma$  pode promover a intensificação de mecanismos inflamatórios como a fagocitose, apresentação de antígenos e estimulação de citocinas, quimiocinas e moléculas com atividade microbicida (Schröder *et*

*al.*, 2004). Todavia, IFN- $\gamma$  também é capaz de exercer um efeito imunomodulador (Cassatella *et al.*, 1993; Meda *et al.*, 1994) em citocinas inflamatórias produzidas por neutrófilos estimulados com LPS. Mais especificamente, alguns estudos (Cassatella *et al.*, 1993; Meda *et al.*, 1994) descrevem a habilidade de IFN- $\gamma$  inibir a produção de IL-8 por neutrófilos estimulados por LPS ou por outros estímulos como TNF- $\alpha$  e formil-metionil-leucil-fenil-alanina (FMLP) (Cassatella *et al.*, 1993). Com base nestas informações, sugerimos que as pequenas concentrações de IL-8 observadas nas culturas de neutrófilos de indivíduos com periodontite e estimulados ou não com LPS bacterianos poderiam ser decorrentes dos elevados níveis de IFN- $\gamma$  encontrados nestas mesmas culturas.

No entanto, nossos resultados divergem de estudos realizados por outros grupos (Yoshimura *et al.*, 1997; Schröder *et al.*, 2006; Restaino *et al.*, 2007) que demonstram um aumento dessa citocina e seu RNAm em neutrófilos que são cultivados na presença de LPS oriundos de bactérias, tais como *E. coli*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga ochracea* e *F. nucleatum*. Sendo assim, acreditamos que os resultados conflitantes são decorrentes das diferentes metodologias empregadas na estimulação, bem como nos variados períodos de incubação das culturas celulares adotados pelos grupos de pesquisa acima citados. Detalhadamente, Yoshimura e colaboradores (1997) e Schröder e colaboradores (2006) relatam maior expressão de IL-8 em neutrófilos de voluntários saudáveis e estimulados com os LPS de periodontopatógenos e *Ec*, respectivamente. Ao passo que, as maiores concentrações de IL-8 também foram observadas por nós quando quantificamos esta citocina no sobrenadante dos neutrófilos de voluntários saudáveis em comparação aos dos indivíduos doentes. Ainda, segundo os dados publicados por Restaino

e colaboradores (2007), os neutrófilos de pacientes com periodontite foram estimulados com LPS de Aa e Pg por apenas 1 hora, enquanto que os períodos de estimulação realizados por nosso grupo foram de 6 e 12 horas, fato que pode influenciar nos resultados finais.

Contudo, as intensidades e padrões de respostas imunológicas iniciadas contra os microrganismos invasores são decorrentes da complexa ação de diversas citocinas produzidas e liberadas por múltiplos tipos celulares em diferentes momentos da resposta imune. Um exemplo desta resposta ocorre durante a periodontite, tornando bastante difícil o esclarecimento de quais fatores podem influenciar negativamente este processo inflamatório. Adicionalmente, torna-se oportuno ressaltar os resultados obtidos através da análise da expressão gênica e quantificação dos peptídeos antimicrobianos e citocinas pode ser devido a um fator fisiológico das células, uma vez que a transcrição do material genético não necessariamente ocorre de modo simultâneo à sua tradução em proteínas.

Os neutrófilos ainda contam com mecanismos microbicidas dependentes de oxigênio, especialmente os representados pela produção de NO (Bogdan, 2001; Lehrer 2004). O NO pode exercer diferentes atividades biológicas (Bogdan, 2001), variando desde a atividade anti-tumoral até a redução da replicação e/ou morte de microrganismos invasores como as bactérias, por exemplo. Algumas bactérias periodontopatogênicas, tais como Aa, Pg e *F. nucleatum* são capazes de induzir a ativação da enzima iNOS, resultando em elevados níveis de NO nos tecidos gengivais bem como no sangue do indivíduos saudáveis (Miyasaki *et al.*, 1986; Sheikhi *et al.*, 2001; Alayan *et al.*, 2006). Corroborando com estes dados, observamos que neutrófilos de voluntários saudáveis foram capazes de

produzir grandes quantidades deste radical tóxico após serem estimulados com LPS de Pg e Ec. Em contrapartida, comparando-se os níveis de NO observamos que neutrófilos de pacientes com periodontite cultivados na presença de LPS de Pg e Ec sintetizaram menores concentrações deste em relação aos saudáveis. Estes resultados vão de encontro com outros trabalhos (Garlet *et al.*, 2008; Guentsch *et al.*, 2009) que descrevem uma maior produção de NO por indivíduos e por animais acometidos pela periodontite que os saudáveis. Tais dados também vão de encontro com trabalhos que afirmam haver forte correlação entre a produção de NO e derivados reativos do oxigênio com os níveis elevados de citocinas como IFN- $\gamma$  (Yamashita *et al.*, 1997; Ellis *et al.*, 2004).

A não correlação entre estes resultados pode ainda estar associada aos diferentes protocolos experimentais utilizados na detecção destas moléculas de NO. Possivelmente, resultados mais representativos poderão ser obtidos se os níveis de expressão da enzima iNOS fosse estudado em neutrófilos. Todavia, a exata função do NO no desenvolvimento de processos inflamatórios como a periodontite, ainda permanece sem um consenso. Com base nestes dados, sugerimos que as reduzidas concentrações de NO nos sobrenadantes dos neutrófilos de doentes periodontais poderiam estar envolvidas na resposta imune deficitária destes indivíduos contra os microrganismos causadores da periodontite, tornando-os mais suscetíveis a esta patologia oral.

Tal hipótese pode ser reforçada por estudos que demonstram que na ausência de NO, seja pela inibição da iNOS ou pela deficiência desta enzima em modelos experimentais, há aumento descontrolado de diferentes bactérias periodontopatogênicas, intensificando a patogênese periodontal (Miyasaki *et al.*, 1986; Alayan *et al.*, 2006; Garlet

*et al.*, 2008). Finalmente, os elevados níveis de LL-37, HNP 1-3 e das citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$  podem representar uma importante tentativa de o sistema imune reagir contra os microrganismos invasores. No entanto, a falha em um destes mecanismos microbicidas, representada pelos baixos níveis de NO produzidos pelos neutrófilos dos voluntários com periodontite poderiam justificar a maior suscetibilidade destes indivíduos à doença periodontal.



## 7. CONCLUSÃO

Baseado nestes resultados, concluimos que:

- A maior produção de LL-37, HNP 1-3 e citocinas inflamatórias IL-12 e IFN- $\gamma$  por neutrófilos humanos está associada à presença da periodontite.
- O LPS de periodontopatógenos em contato com neutrófilos sanguíneos pode estimular a síntese de catelicidina e  $\alpha$ -defensinas de maneiras distintas.
- Os LPS de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* podem induzir maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias nos indivíduos com periodontite.
- Neutrófilos dos voluntários com periodontite, estimulados ou não com LPS das bactérias periodontopatogênicas, produzem baixos níveis de NO quando comparados aos neutrófilos de indivíduos saudáveis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abiko Y, Nishimura M, Kaku T. Defensins in saliva and the salivary glands. *Med Electron Microsc.* 2003; 36(4): 247-52.

Alayan J, Ivanovski S, Gemmell E, Ford P, Hamlet S, Farah CS. Deficiency of iNOS contributes to *Porphyromonas gingivalis*-induced tissue damage. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21(6): 360-5.

Allavena P, Paganin C, Zhou D, Bianchi G, Sozzani S, Mantovani A. Interleukin-12 is chemotactic for natural killer cells and stimulates their interaction with vascular endothelium. *Blood.* 1994; 84(7): 2261-8.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999; 4(1): 1-6.

Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(16): 9541-6.

Bazzoni F, Cassatella MA, Rossi F, Ceska M, Dewald B, Baggiolini M. Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. *J Exp Med.* 1991; 173(3): 771-4.

Berent R, Auer J, Schmid P, Krennmair G, Crouse SF, Green JS, Sinzinger H, von Duvillard SP. Periodontal and coronary heart disease in patients undergoing coronary angiography. *Metabolism.* 2010. *Epub ahead of print.*

Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* 2001; 2(10): 907-16.

Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3(3): 238-50.

Bucki R, Leszczyńska K, Namiot A, Sokołowski W. Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2010; 58(1): 15-25.

Carlsson G, Wahlin YB, Johansson A, Olsson A, Eriksson T, Claesson R, Hänström L, Henter JJ. Periodontal disease in patients from the original Kostmann family with severe congenital neutropenia. *J Periodontol*. 2006; 77(4): 744-51.

Cassatella MA, Guasparri I, Ceska M, Bazzoni F, Rossi F. Interferon-gamma inhibits interleukin-8 production by human polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* 1993; 78: 177-84.

Cassatella MA, Meda L, Gasperini S, D'Andrea A, Ma X, Trinchieri G. Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Immunol*. 1995; 25(1): 1-5.

Chen X, Niyonsaba F, Ushio H, Okuda D, Nagaoka I, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Synergistic effect of antibacterial agents human beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Dermatol Sci*. 2005; 40(2): 123-32.

Chertov O, Michiel DF, Xu L, Wang JM, Tani K, Murphy WJ, Longo DL, Taub DD, Oppenheim JJ. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem*. 1996; 271(6): 2935-40.

Cid J, Aguinaco R, Sánchez R, García-Pardo G, Llorente A. Neutrophil CD64 expression as marker of bacterial infection: A systematic review and meta-analysis. *J Infect*. 2010. *in press*.

Ciornei CD, Sigurdardóttir T, Schmidtchen A, Bodelsson M. Antimicrobial and chemoattractant activity, lipopolysaccharide neutralization, cytotoxicity, and inhibition by serum of analogs of human cathelicidin LL-37. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(7): 2845-50.

Comabella M, Balashov K, Issazadeh S, Smith D, Weiner HL, Khoury SJ. Elevated interleukin-12 in progressive multiple sclerosis correlates with disease activity and is normalized by pulse cyclophosphamide therapy. *J Clin Invest.* 1998; 102(4): 671-8.

Cowland JB, Johnsen AH, Borregaard N. hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett.* 1995; 368(1): 173-6.

Daher KA, Selsted ME, Lehrer RI. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J Virol.* 1986; 60(3): 1068-74.

Dale BA, Krisanaprakornkit S. Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. *J Oral Pathol Med.* 2001; 30(6): 321-7.

Davis BH. Improved diagnostic approaches to infection/sepsis detection. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005; 5(2): 193-207.

Davison G, Allgrove J, Gleeson M. Salivary antimicrobial peptides (LL-37 and alpha-defensins HNP 1-3), antimicrobial and IgA responses to prolonged exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2009; 106(2): 277-84.

De Yang, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Oppenheim JJ, Chertov O. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med.* 2000; 192(7): 1069-74.

Del Fabbro M, Francetti L, Pizzoni L, Weinstein RL. Congenital neutrophil defects and periodontal diseases. *Minerva Stomatol.* 2000; 49(6): 293-311.

Diamond G, Beckloff N, Ryan LK. Host defense peptides in the oral cavity and the lung: similarities and differences. *J Dent Res.* 2008; 87(10): 915-27.

Doss M, White MR, Teclé T, Hartshorn KL. Human defensins and LL-37 in mucosal immunity. *J Leukoc Biol.* 2010; 87(1): 79-92.

Ebersole JL, Taubman MA. The protective nature of host responses in periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1994; 5: 112-41.

Ellis TN, Beaman BL. Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function. *Immunology*. 2004; 112(1): 2-12.

Enberg N, Wolf J, Ainamo A, Alho H, Heinala P, Lenander-Lumikari M. Dental diseases and loss of teeth in a group of Finnish alcoholics: a radiological study. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2001; 59: 341-7.

Ethuin F, Delarche C, Benslama S, Gougerot-Pocidallo MA, Jacob L, Chollet-Martin S. Interleukin-12 increases interleukin-8 production and release by human polymorphonuclear neutrophils. *J Leukoc Biol*. 2001; 70(3): 439-46.

Ethuin F, Gérard B, Benna JE, Boutten A, Gougereot-Pocidallo MA, Jacob L, Chollet-Martin S. Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12. *Lab Invest*. 2004; 84(10): 1363-71.

Flemmig TF. Periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999; 4: 32-38.

Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Ståhle-Bäckdahl M, Lidén S, Wigzell H, Gudmundsson GH. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem*. 1997; 272(24): 15258-63.

Frohm Nilsson M, Sandstedt B, Sørensen O, Weber G, Borregaard N, Ståhle-Bäckdahl M. The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infect Immun*. 1999; 67(5): 2561-6.

Furci L, Sironi F, Tolazzi M, Vassena L, Lusso P. Alpha-defensins block the early steps of HIV-1 infection: interference with the binding of gp120 to CD4. *Blood*. 2007; 109(7): 2928-35.

Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial peptides of leukocytes. *Curr Opin Hematol.* 1997; 4(1): 53-8.

Ganz T, Lehrer RI. Defensins. *Curr Opin Immunol.* 1994; 6: 584–589.

Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest.* 1985; 76: 1424–1435.

Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Garlet TP, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, Silva JS. The essential role of IFN-gamma in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *Microbes Infect.* 2008; 10(5): 489-96.

Golec M. Cathelicidin LL-37: LPS-neutralizing, pleiotropic peptide. *Ann Agric Environ Med.* 2007; 14(1): 1-4.

Górska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madaliński K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2003; 30(12): 1046-52.

Griffin JD, Spertini O, Ernst TJ, et al. Granulocyte–macrophage colonystimulating factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, and their precursors. *J Immunol* 1990; 145: 576–84.

Grigat J, Soruri A, Forssmann U, Riggert J, Zwirner J. Chemoattraction of macrophages, T lymphocytes, and mast cells is evolutionarily conserved within the human alpha-defensin family. *J Immunol.* 2007; 179(6): 3958-65.

Guentsch A, Puklo M, Preshaw PM, Glockmann E, Pfister W, Potempa J, Eick S. Neutrophils in chronic and aggressive periodontitis in interaction with *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res.* 2009; 44(3): 368-77.

Guthmiller JM, Vargas KG, Srikantha R, Schomberg LL, Weistroffer PL, McCray PB Jr, Tack BF. Susceptibilities of oral bacteria and yeast to mammalian cathelicidins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(11): 3216-9.

Hajishengallis G. *Porphyromonas gingivalis*-host interactions: open war or intelligent guerilla tactics? *Microbes Infect.* 2009, 11(6-7):637-45.

Hancock RE. Antibacterial peptides and the outer membranes of gram-negative bacilli. *J Med Microbiol.* 1997; 46(1): 1-3.

Hase K, Eckmann L, Leopard JD, Varki N, Kagnoff MF. Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium. *Infect Immun.* 2002; 70(2): 953-63.

Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003; 102: 2660-69.

Hecht G. Innate mechanisms of epithelial host defense: spotlight on intestine. *Am J Physiol.* 1999; 277(3): C351-8.

Henzler Wildman KA, Lee DK, Ramamoorthy A. Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. *Biochemistry.* 2003; 42(21): 6545-58.

Hirahashi J, Hishikawa K, Kaname S, Tsuboi N, Wang Y, Simon DI, Stavrakis G, Shimosawa T, Xiao L, Nagahama Y, Suzuki K, Fujita T, Mayadas TN. Mac-1 (CD11b/CD18) links inflammation and thrombosis after glomerular injury. *Circulation.* 2009; 120(13): 1255-65.

Honda T, Aoki Y, Takahashi N, Maekawa T, Nakajima T, Ito H, Tabeta K, Okui T, Kajita K, Domon H, Yamazaki K. Elevated expression of IL-17 and IL-12 genes in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Chim Acta.* 2008; 395(1-2): 137-41.

Hosokawa I, Hosokawa Y, Komatsuzawa H, Gonçalves RB, Karimbux N, Napimoga MH, Seki M, Ouhara K, Sugai M, Taubman MA, Kawai T. Innate immune peptide LL-37

displays distinct expression pattern from beta-defensins in inflamed gingival tissue. Clin Exp Immunol. 2006; 146(2): 218-25.

Houri-Haddad Y, Soskoine WA, Shapira L. Immunization to *Porphyromonas gingivalis* enhances the local pro-inflammatory response to subcutaneous bacterial challenge. J Clin Periodontol. 2001; 28(5): 476-82.

Huang H. W. Action of antimicrobial peptides: two-state model. Biochemistry. 2000; 39: 8347-8352.

Ishimoto H, Mukae H, Sakamoto N, Amenomori M, Kitazaki T, Imamura Y, Fujita H, Ishii H, Nakayama S, Yanagihara K, Kohno S. Different effects of telithromycin on MUC5AC production induced by human neutrophil peptide-1 or lipopolysaccharide in NCI-H292 cells compared with azithromycin and clarithromycin. J Antimicrob Chemother. 2009; 63(1): 109-14.

Isomoto H, Mukae H, Ishimoto H, Date Y, Nishi Y, Inoue K, Wada A, Hirayama T, Nakazato M, Kohno S. Elevated concentrations of alpha-defensins in gastric juice of patients with *Helicobacter pylori* infection. Am J Gastroenterol. 2004; 99(10): 1916-23.

Ji S, Kim Y, Min BM, Han SH, Choi Y. Innate immune responses of gingival epithelial cells to nonperiodontopathic and periodontopathic bacteria. J Periodontal Res. 2008; 43(1): 126.

Johansson AS, Svensson KG, Trulsson M. Impaired masticatory behavior in subjects with reduced periodontal tissue support. J Periodontol. 2006; 77(9): 1491-7.

Johansson L, Thulin P, Sendi P, Hertzén E, Linder A, Akesson P, Low DE, Agerberth B, Norrby-Teglund A. Cathelicidin LL-37 in severe *Streptococcus pyogenes* soft tissue infections in humans. Infect Immun. 2008; 76(8): 3399-404.

Kim W, Min S, Cho M, Youn J, Min J, Lee S, Park S, Cho C, Kim H. The role of IL-12 in inflammatory activity of patients with rheumatoid arthritis (RA). Clin Exp Immunol. 2000; 119(1): 175-81.



Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil Mac-1 and Mel-14 adhesion proteins are inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 1989; 245: 1238–41.

Kobayashi H, Nagasawa T, Aramaki M, Mahanonda R, Ishikawa I. Individual diversities in interferon gamma production by human peripheral blood mononuclear cells stimulated with periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res.* 2000; 35(6): 319-28.

Kobayashi SD, Voyich JM, DeLeo FR. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect.* 2003; 5(14): 1337-44.

Kobayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci.* 2008; 13: 2400-7.

Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krötz F, Zahler S, Gloe T, Issbrücker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, Karl A, Raake P, Pfosser A, Boekstegers P, Welsch U, Hiemstra PS, Vogelmeier C, Gallo RL, Clauss M, Bals R. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest.* 2003; 111(11): 1665-72.

Kowolik MJ, Dowsett SA, Rodriguez J, De La Rosa RM, Eckert GJ. Systemic neutrophil response resulting from dental plaque accumulation. *J Periodontol.* 2001; 72(2): 146-51.

Lam HS, Ng PC. Biochemical markers of neonatal sepsis. *Pathology.* 2008; 40(2): 141-8.

Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun.* 1995; 63(4): 1291-7.

Larrick JW, Hirata M, Shimomoura Y, Yoshida M, Zheng H, Zhong J, Wright SC. Rabbit CAP18 derived peptides inhibit gram negative and gram positive bacteria. *Prog Clin Biol Res.* 1994; 388: 125-35.

Lehrer RI, Barton A, Daher KA, Harwig SS, Ganz T, Selsted ME. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest.* 1989; 84(2): 553-61.

Lehrer RI, Daher K, Ganz T, Selsted ME. Direct inactivation of viruses by MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics from rabbit leukocytes. *J Virol.* 1985; 54(2): 467-72.

Lehrer RI, Ganz T, Szklarek D, Selsted ME. Modulation of the in vitro candidacidal activity of human neutrophil defensins by target cell metabolism and divalent cations. *J Clin Invest.* 1988; 81(6): 1829-35.

Lehrer RI. Primate defensins. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2(9): 727-38.

Levy O. Antibiotic proteins of polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Haematol.* 1996; 56(5): 263-77.

Lillard JW Jr, Boyaka PN, Chertov O, Oppenheim JJ, McGhee JR. Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(2): 651-6.

Liu RK, Cao CF, Meng HX, Gao Y. Polymorphonuclear neutrophils and their mediators in gingival tissues from generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2001; 72(11): 1545-53.

Lohner K, Latal A, Lehrer RI & Ganz T. Differential scanning microcalorimetry indicates that human defensin, HNP-2, interacts specifically with biomembrane mimetic systems. *Biochemistry.* 1997; 36: 1525–1531.

Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Wertheim-van Dillen PM, van der Velden U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *J Periodontol.* 2000; 71(10): 1528-34.

Lundy FT, Orr DF, Shaw C, Lamey PJ, Linden GJ. Detection of individual human neutrophil alpha-defensins (human neutrophil peptides 1, 2 and 3) in unfractionated gingival crevicular fluid-a MALDI-MS approach. *Mol Immunol.* 2005, 42(5): 575-9.

Madianos PN, Papapanou PN, Sandros J. *Porphyromonas gingivalis* infection of oral epithelium inhibits neutrophil transepithelial migration. *Infect Immun.* 1997; 65(10): 3983-90.

Matsuzaki K. Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self defence? *Biochem. Soc Trans.* 2001; 29: 598–601.

Matthews JB, Wright HJ, Roberts A, Cooper PR, Chapple IL. Hyperactivity and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis. *Clin Exp Immunol.* 2007; 147(2): 255-64.

Meda L, Gasperini S, Ceska M, Cassatella MA. Modulation of proinflammatory cytokine release from human polymorphonuclear leukocytes by gamma interferon. *Cell Immunol.* 1994; 157(2): 448-61.

Menezes GB, Lee WY, Zhou H, Waterhouse CC, Cara DC, Kubes P. Selective down-regulation of neutrophil Mac-1 in endotoxemic hepatic microcirculation via IL-10. *J Immunol.* 2009; 183(11): 7557-68.

Meng H, Xu L, Li Q, Han J, Zhao Y. Determinants of host susceptibility in aggressive periodontitis. *Periodontol 2000.* 2007; 43: 133-59.

Miller DR, Lamster IB, Chasens AI. Role of the polymorphonuclear leukocyte in periodontal health and disease. *J Clin Periodontol.* 1984; 11(1): 1-15.

Miyasaki KT, Wilson ME, Brunetti AJ, Genco RJ. Oxidative and nonoxidative killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by human neutrophils. *Infect Immun.* 1986; 53: 154-160.

Moimaz SA, Zina LG, Saliba O, Garbin CA. Smoking and periodontal disease: clinical evidence for an association. *Oral Health Prev Dent.* 2009; 7(4): 369-76.

Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DM, Doria S, Falsafi R, Hokamp K, Roche FM, Mu R, Doho GH, Pistolic J, Powers JP, Bryan J, Brinkman FS, Hancock RE. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *J Immunol.* 2006; 176(4): 2455-64.

Mukae H, Ishimoto H, Yanagi S, Ishii H, Nakayama S, Ashitani J, Nakazato M, Kohno S. Elevated BALF concentrations of alpha- and beta-defensins in patients with pulmonary alveolar proteinosis. *Respir Med.* 2007; 101(4): 715-21.

Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA, Gallo RL. Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. *J Dent Res.* 2002; 81(12): 845-50.

Nagaoka I, Hirota S, Yomogida S, Ohwada A, Hirata M. Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins. *Inflamm Res.* 2000; 49(2): 73-9.

Nakajima T, Yamazaki K, Cullinan MP, Gemmell E, Seymour GJ. T-cell antigen specificity in humans following stimulation with *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Oral Biol.* 1999; 44(12): 1045-53.

Ng PC, Lam HS. Diagnostic markers for neonatal sepsis. *Curr Opin Pediatr* 2006; 18: 125-31.

Nishihara T, Koseki T. Microbial etiology of periodontitis. *Periodontol 2000.* 2004; 36: 14-26.

Niyonsaba F, Iwabuchi K, Someya A, Hirata M, Matsuda H, Ogawa H, Nagaoka I. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. *Immunology.* 2002; 106(1):20-6.

Niyonsaba F, Someya A, Hirata M, Ogawa H, Nagaoka I. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *Eur J Immunol.* 2001; 31(4): 1066-75.

Nizet V, Ohtake T, Lauth X, Trowbridge J, Rudisill J, Dorschner RA, Pestonjamas V, Piraino J, Huttner K, Gallo RL. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature.* 2001; 414(6862): 454-7.

Orr Y, Taylor JM, Cartland S, Bannon PG, Geczy C, Kritharides L. Conformational activation of CD11b without shedding of L-selectin on circulating human neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2007; 82(5): 1115-25.

Oscarsson J, Karched M, Thay B, Chen C, Asikainen S. Proinflammatory effect in whole blood by free soluble bacterial components released from planktonic and biofilm cells. *BMC Microbiol.* 2008; 8: 206.

Ouhara K, Komatsuzawa H, Yamada S, Shiba H, Fujiwara T, Ohara M, Sayama K, Hashimoto K, Kurihara H, Sugai M. Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides,  $\beta$ -defensins and LL37, produced by human epithelial cells. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 55(6): 888-96.

Parker LC, Whyte MK, Dower SK, Sabroe I. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol.* 2005; 77(6): 886-92.

Passo SA, Syed SA, Silva J Jr. Neutrophil chemiluminescence in response to *Fusobacterium nucleatum*. *J Periodontal Res.* 1982; 17(6): 604-13.

Puklo M, Guentsch A, Hiemstra PS, Eick S, Potempa J. Analysis of neutrophil-derived antimicrobial peptides in gingival crevicular fluid suggests importance of cathelicidin LL-37 in the innate immune response against periodontogenic bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23(4): 328-35.

Pütsep K, Carlsson G, Boman HG, Andersson M. Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study. *Lancet.* 2002; 360(9340): 1144-9.

Restaino CG, Chaparro A, Valenzuela MA, Kettlun AM, Vernal R, Silva A, Puente J, Jaque MP, León R, Gamonal J. Stimulatory response of neutrophils from periodontitis patients with periodontal pathogens. *Oral Dis.* 2007; 13(5): 474-81.

Risso A. Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity. *J Leukoc Biol.* 2000; 68: 785-792.

Rivas-Santiago B, Hernandez-Pando R, Carranza C, Juarez E, Contreras JL, Aguilar-Leon D, Torres M, Sada E. Expression of cathelicidin LL-37 during *Mycobacterium tuberculosis* infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells. *Infect Immun.* 2008; 76(3): 935-41.

Rosenfeld Y, Papo N, Shai Y. Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action. *J Biol Chem.* 2006; 281(3): 1636-43.

Sakamoto N, Mukae H, Fujii T, Ishii H, Yoshioka S, Kakugawa T, Sugiyama K, Mizuta Y, Kadota J, Nakazato M, Kohno S. Differential effects of alpha- and beta-defensin on cytokine production by cultured human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005; 288(3): L508-13.

Schröder AK, von der Ohe M, Kolling U, Altstaedt J, Uciechowski P, Fleischer D, Dalhoff K, Ju X, Zenke M, Heussen N, Rink L. Polymorphonuclear leucocytes selectively produce anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist and chemokines, but fail to produce pro-inflammatory mediators. *Immunology*. 2006; 119(3): 317-27.

Schröder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004; 75(2): 163-89.

Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock RE. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J Immunol*. 2002; 169(7): 3883-91.

Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90(21): 10188-92.

Sheikhi M, Bouhafs RK, Hammarström KJ, Jarstrand C. Lipid peroxidation caused by oxygen radicals from *Fusobacterium*-stimulated neutrophils as a possible model for the emergence of periodontitis. *Oral Dis*. 2001; 7(1): 41-6.

Singh PK, Tack BF, McCray PB Jr, Welsh MJ. Synergistic and additive killing by antimicrobial factors found in human airway surface liquid. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 279(5): L799-805.

Slots J, Ting M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol* 2000. 1999; 20: 82-121.

- Stashenko P, Gonçalves RB, Lipkin B, Ficarelli A, Sasaki H, Campos-Neto A. Th1 immune response promotes severe bone resorption caused by *Porphyromonas gingivalis*. *Am J Pathol*. 2007; 170(1): 203-13.
- Stead A, Main JS, Wardm E, Watt PJ. Studies on lipopolysaccharides isolated from strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of General Microbiology*. 1975; 88: 123-31.
- Street NE, Mosmann TR. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J*. 1991; 5(2): 171-7.
- Sugita N, Kimura A, Matsuki Y, Yamamoto T, Yoshie H, Hara K. Activation of transcription factors and IL-8 expression in neutrophils stimulated with lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *Inflammation*. 1998; 22(3): 253-67.
- Suri S, Taylor MA, Verity A, Tribolo S, Needs PW, Kroon PA, Hughes DA, Wilson VG. A comparative study of the effects of quercetin and its glucuronide and sulfate metabolites on human neutrophil function in vitro. *Biochem Pharmacol*. 2008; 76(5): 645-53.
- Tanaka D, Miyasaki KT, Lehrer RI. Sensitivity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Capnocytophaga* spp. to the bactericidal action of LL-37: a cathelicidin found in human leukocytes and epithelium. *Oral Microbiol Immunol*. 2000; 15(4): 226-31.
- Tarlowe MH, Kannan KB, Itagaki K, Adams JM, Livingston DH, Hauser CJ. Inflammatory chemoreceptor cross-talk suppresses leukotriene B4 receptor 1-mediated neutrophil calcium mobilization and chemotaxis after trauma. *J Immunol*. 2003; 171(4): 2066-73.
- Tecle T, White MR, Gantz D, Crouch EC, Hartshorn KL. Human neutrophil defensins increase neutrophil uptake of influenza A virus and bacteria and modify virus-induced respiratory burst responses. *J Immunol*. 2007; 178(12): 8046-52.
- Territo MC, Ganz T, Selsted ME, Lehrer R. Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J Clin Invest*. 1989; 84(6): 2017-20.
- Trinchieri G. Immunobiology of interleukin-12. *Immunol Res*. 1998; 17(1-2): 269-78.

Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3(2): 133-46.

Tsai IS, Tsai CC, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. Interleukin-12 and interleukin-16 in periodontal disease. *Cytokine.* 2005; 31(1): 34-40.

Türkoğlu O, Emingil G, Kütükçüler N, Atilla G. Gingival crevicular fluid levels of cathelicidin LL-37 and interleukin-18 in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2009; 80(6): 969-76.

Ukai T, Mori Y, Onoyama M, Hara Y. Immunohistological study of interferon-gamma and interleukin-4 bearing cells in human periodontitis gingiva. *Arch Oral Biol.* 2001; 46(10): 901-8.

Van Dyke TE, Hoop GA. Neutrophil function and oral disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1990; 1(2): 117-33.

Vega A, El Bekay R, Chacón P, Ventura I, Monteseirín J. Angiotensin II induces CD62L shedding in human neutrophils. *Atherosclerosis.* 2010; 209(2): 344-51.

Wahaidi VY, Dowsett SA, Eckert GJ, Kowolik MJ. Neutrophil response to dental plaque by gender and race. *J Dent Res.* 2009, 88(8): 709-14.

Wang G. Structure, dynamics and mapping of membrane-binding residues of micelle-bound antimicrobial peptides by natural abundance (13)C NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1798(2): 114-21.

Weinrauch Y, Foreman A, Shu C, Zarembek K, Levy O, Elsbach P, Weiss J. Extracellular accumulation of a potent microbicidal bactericidal/permeability-increasing protein and p15s in an evolving sterile rabbit peritoneal inflammatory exudate. *J Clin Invest.* 1995; 95(4): 1916-24.

Westphal O and Jann K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol–water and further applications of the procedure. *Methods in Carbohydrate Chemistry.* 1965; 5: 83–91.



Wilde CG, Griffith JE, Marra MN, Snable JL, Scott RW. Purification and characterization of human neutrophil peptide 4, a novel member of the defensin family. *J Biol Chem.* 1989; 264(19): 11200-3.

Yamashita T, Uchida T, Araki A, Sendo F. Nitric oxide is an effector molecule in inhibition of tumor cell growth by rIFN-gamma-activated rat neutrophils. *Int J Cancer.* 1997; 71(2): 223-30.

Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2000; 8(1): 9-14.

Yawalkar N, Karlen S, Hunger R, Brand CU, Braathen LR. Expression of interleukin-12 is increased in psoriatic skin. *J Invest Dermatol.* 1998; 111(6): 1053-7.

Yoshimura A, Hara Y, Kaneko T, Kato I. Secretion of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-8 and IL-1ra by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res.* 1997; 32(3): 279-86.

Yücel OO, Berker E, Gariboğlu S, Otlu H. Interleukin-11, interleukin-1beta, interleukin-12 and the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(5): 365-70.

Zasloff M. Antimicrobial peptides in health and disease. *N Engl J Med.* 2002; 347(15): 1199-200.