

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

**ENVOLVIMENTO DE SINAIS CO-ESTIMULATÓRIOS NA PROGRESSÃO DAS
DOENÇAS PERIODONTAIS HUMANAS**

EDUARDO ALEIXO FIGUEIRA

Bauru - SP

2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

**ENVOLVIMENTO DE SINAIS CO-ESTIMULATÓRIOS NA PROGRESSÃO DA
DOENÇAS PERIODONTAIS HUMANAS**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de MESTRE em Odontologia, área de Estomatologia e Biologia Oral.

Aluno: Eduardo Aleixo Figueira

Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Campanelli

Bauru - SP

2007

Figueira, Eduardo Aleixo

F469e Envolvimento de sinais co-estimulatórios na progressão das doenças periodontais humanas/ Eduardo Aleixo Figueira - Bauru, 2007.

xxxii, 86 p. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Campanelli

Autorizo, exclusivamente pra fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e/ou meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data:

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da FOB-USP:
projeto de pesquisa aprovado em 22 de fevereiro de 2005.

Número do protocolo: 115/2004

EDUARDO ALEIXO FIGUEIRA

Dados Curriculares

12 de outubro de 1980 Rio de Janeiro/ RJ	Nascimento
Filiação	João Marcos Sales Figueira Vânia Leni Aleixo Figueira
1999 - 2002	Graduação em Odontologia na Faculdade de Odontologia de Bauru / Universidade de São Paulo
2003 - 2004	Programa de Capacitação Profissional na Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru / Universidade de São Paulo
2005 - Atual	Mestrado em Estomatologia e Biologia Oral, Área de Concentração Biologia Oral na Faculdade de Odontologia de Bauru / Universidade de São Paulo

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia e Micorbiologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo.

Apoio: FAPESP.

Dedicatória

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe, *Vânia Leni Aleixo Figueira (in memorian)*, uma pessoa especial, dedicada, atenciosa, carinhosa, amiga, acima de tudo mãe, que teve um papel fundamental na minha formação, educação, e principalmente na construção do meu caráter. Infelizmente, hoje não está mais presente entre nós, mas com certeza viverá eternamente em meus pensamentos...

Ao meu pai, *João Marcos Sales Figueira*, que em todos esses anos vem me apoiando, incentivando, fazendo o possível e o impossível para o meu enriquecimento humano e profissional. E acima de tudo proporcionando momentos de muita alegria e felicidade.

Agradecimento

Agradecimentos

A **Profa. Dra. Ana Paula Campanelli**, pelas experiências e conhecimentos transmitidos, pelo exemplo de dedicação à carreira e à profissão, pelo rigor científico com que conduz seus trabalhos, e pela amizade construída durante o mestrado.

Aos Professores, **Prof. Dr. João Santana da Silva**, **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos** e **Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet**, que direta ou indiretamente auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus irmãos, **Maurício e Juciara**, que além de irmãos e amigos, também são colegas de trabalho, com os quais aprendo muito.

Às minhas sobrinhas, **Cynthia e Luana**, que fazem a minha vida mais alegre.

À **Aguida, Denise** e sua **filha Amanda**, que hoje fazem parte da minha família;

À minha namorada, **Tânia Hashizume**, por toda paciência e carinho que ela tem me proporcionado durante todos esses anos de convivência, que foram essenciais nesses anos de mestrado.

À seus pais **Toyoshi e Yooko**, e seus irmãos, **Hélio e Raquel**, que me acolheram com muito carinho;

Ao meu amigo **Danilo**, pela amizade e companheirismo sempre presente e à seus pais, **Ivan e Arlene**, e seus irmãos, **Liciane e Fabrício**, pelos momentos de descontração e alegria;

À **Flora** e seus filhos **André e Thiago**, que me acolheram de braços abertos, logo que cheguei a Bauru,

Aos meus colegas e amigos de graduação, em especial, **Rodrigo** (Tio), **Renan** (Chupeta), **Thiago** (Senil), **Willian** (Palito), **Kleber** (Ligeiro), **Ivan** (Ripe), **Daniel** (Figura) pela a amizade e companheirismo;

Aos meus colegas da microbiologia, **Rodrigo, André, Dalva, Ronan, Thais, Carla, Tati Sales, Valéria, Victor, Ana Paula, Vanessa** por compartilhar seus pensamentos, pelo apoio nos momentos difíceis e presença nos momentos felizes;

Aos Professores e colegas da periodontia, **Prof. Dr. Sebastião Luis Aguiar Gregghi, Prof. Dr. Euloir Passanezi, Profa. Dra. Maria Lucia Rubo de Rezende, Profa. Dra. Adriana Campos Passanezi Sant'Ana**, por todos os conhecimentos transmitidos; à **Ivânia, Edilaine** e ao **Marcão** pela convivência agradável e muito acolhedora;

Aos meus colegas bioquímicos, **Prof. Dr. Mauro Granjeiro, Prof. Dr. Rodrigo de Oliveira, Profa. Dra. Marilia Buzalaf, Thelma, Ovídio, Claudinha, Juliano, Rejane** e em especial as minhas amigas **Esther e Irene** pelo incentivo e companheirismo sempre presente;

Aos funcionários do Serviço de Urgência Odontológica e do Setor de Triagem desta Faculdade, pelo cuidado e colaboração para o desfecho desse trabalho;

As técnicas do laboratório de citometria de fluxo do Hospital Amaral Carvalho (Jau), pelo auxílio prestado durante a fase laboratorial desse trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Imunologia de Ribeirão Preto, em especial **Alessandra e Cristina** pelo apóio e auxílio prestado;

Aos meus pacientes, que contribuíram imensamente para realização deste trabalho e mais ainda para o meu enriquecimento profissional;

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Resumo

A manutenção da resposta imune depende de uma fina regulação da ativação dos linfócitos. A ativação das células T requer dois sinais, um mediado pelo complexo TCR, após o reconhecimento do antígeno, e o outro mediado pela interação dos receptores co-estimulatórios. CD28 e ICOS são receptores estimuladores, enquanto CTLA-4 e PD-1 induzem um sinal inibitório para a ativação das células T. Para compreender o envolvimento de células T na progressão da doença periodontal humana avaliamos o perfil de ativação de células T sangüíneas, a presença destas células no foco da infecção, bem como os fatores que estas células estariam produzindo. Os resultados mostraram que linfócitos sangüíneos de pacientes com doenças periodontais proliferaram frente à estimulação policlonal, de maneira similar aos linfócitos de indivíduos saudáveis. Entretanto, a estimulação com antígenos de Aa e Pg induziu apenas um discreto aumento na resposta proliferativa de linfócitos de pacientes com gengivite. Os dados também demonstraram que antígenos de periodontopatógenos induzem a produção de citocinas, IFN- γ e IL-10, por linfócitos de pacientes e indivíduos controle. As células sangüíneas de indivíduos com doenças periodontais apresentaram uma alta expressão de moléculas inibitórias, PD-1 e CTLA-4. Entretanto, o bloqueio da via PD-1/PD-L não alterou a resposta proliferativa de células T de pacientes com periodontite crônica, mas modulou positivamente a produção de IFN- γ e IL-10. Ao avaliar o número total de células isoladas do tecido gengival de pacientes com periodontite crônica observou-se um significativo aumento quando comparado ao grupo com gengivite e o controle. Em adição, os ensaios de fenotipagem indicaram que não existe diferença na composição do infiltrado celular. Contudo, foram observadas diferenças entre os grupos quanto ao perfil de ativação celular. Os linfócitos T CD3⁺ representam a principal população de leucócitos encontrados nas lesões de pacientes com periodontite crônica, gengivite e saudáveis, tendo sido detectado uma alta percentagem de células T CD4⁺ de memória no grupo com periodontite crônica. Adicionalmente, o número de células B foi similar em todos os grupos. Os dados sobre a expressão de moléculas co-estimulatórias mostraram que uma considerável parcela da população de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ das lesões de pacientes com periodontite crônica co-expressam PD-1 e CTLA-4, quando comparada com os pacientes com gengivite e indivíduos saudáveis. Uma baixa frequência de positividade para a IFN- γ foi observada nas lesões de pacientes com periodontite crônica, e alta frequência para IL-10 nos grupos com gengivite e periodontite crônica. Esses resultados agrupados sustentam a hipótese de que a expressão de PD-1 e CTLA-4 estão envolvidas na patogênese da doença periodontal humana.

Palavra Chave: Doenças Periodontais; Imunidade Celular, Citocinas

Abstract

Negative co-stimulatory signals mediated via cell surface molecules such as cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) and programmed death-1 (PD-1) play a critical role in down-modulation immune responses and maintaining peripheral tolerance. Both CTLA-4 and PD-1 are induced on activated T cells, and these are involved in the immunopathogenesis of periodontal diseases. However, there are no reports linking PD-1 with periodontal diseases. We investigated the possible association between CD28, CTLA-4 and PD-1 expression and cytokine production with putative lymphocytes dysfunction in patients with periodontal diseases. Blastogenic response to PHA was no difference between groups. However, blastogenic response to Aa and Pg antigen was increased in gingivitis group. After stimulation with antigens or PHA, IL-10 and IFN- γ production was induced *in vitro* by PBMCs from patients with periodontal disease and healthy subjects. The expression of CTLA-4 and PD-1 was higher in blood T cells from patients as compared with the healthy groups. However, blockage of PD-1 did not modify blastogenic response, but resulted in modulation of IFN- γ and IL-10 production. *In situ*, we observed a significant increase in the total number of leukocytes from chronic periodontitis lesion as compared with the gingivitis and healthy groups. Additionally, there was no difference in the composition of cellular infiltrate. The results showed that CD3⁺ T cells represented the main population; in particular, the proportion of CD4⁺ T cells was significantly higher than CD8⁺ T cells, in chronic periodontitis groups. The expression of CD28 was similar in both groups studied. On the other hand, the expression of CTLA-4 and PD-1 was significantly higher in T cells from chronic periodontitis groups as compared with the gingivitis group. Importantly, PD-1 expression was observed primarily in CD4⁺ T cells. Similar amounts of T cells expressing CD28⁺ and CTLA-4⁺ were found in gingivitis and chronic periodontitis patients. This study demonstrates the expression of PD-1 and CTLA-4 in T cells of blood and lesions from patients with periodontal diseases and suggests the possible involvement of these molecules on immune regulation of periodontal disease.

Keyword: Periodontal Disease; Immunity, Cellular; Cytokines

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs	células apresentadoras de antígeno
BHI	brain heart infusion
BSA	“albumin bovine fraction”
BSA	Albumina do soro bovino (bovine serum albumin)
CD	Agrupamento de diferenciação (Cluster of differentiation)
CW	Parede celular deslipidada
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindole, dihidroclorídrico
GKO	Camundongos geneticamente deficientes de IFN- γ
H&E	Hematoxilina e eosina
IFN	Interferon
IL	Interleucina
L32	Proteína ribossomal
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Linfotoxina
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1 (Monocyte chemoattractant protein-1)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MMP	Metaloproteinase
MIP-1α	Proteína inflamatória de macrófago-1 α (Macrophage inflammatory protein-1 α)
MIP-1β	Proteína inflamatória de macrófago-1 β (Macrophage inflammatory protein-1 β)
MIP-2	Proteína inflamatória de macrófago-2 (Macrophage inflammatory protein-2)
NK	células “natural killer”
NO	óxido nítrico
p55KO	Camundongos geneticamente deficientes do receptor p55 de TNF- α
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>

PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	solução salina tamponada em fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PHA	Fitohemaglutinina
RANTES	Quimiocina expressa e secretada por células T normais e regulada após ativação (Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted)
rpm	rotações por minuto
RPMI-1640	meio de cultura de células
Th	Linfócito T auxiliar (helper)
TNF	Fator de Necrose Tumoral (Tumor Necrosis Factor)

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO.....	1
II.	PROPOSIÇÃO.....	19
III.	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
	1. Seleção de pacientes.....	22
	2. Estabelecimento da cultura de <i>A. actinomycetemcomitans</i> e <i>P. gingivalis</i>	23
	3. Obtenção dos componentes antigênicos utilizados como estímulo.....	24
	4. Anticorpos.....	24
	5. Isolamento de leucócitos humanos.....	25
	6. Cultura de leucócitos humanos.....	25
	7. Separação de leucócitos das amostras de tecido gengival.....	26
	8. Citometria de fluxo para a análise de expressão de moléculas de superfície.....	26
	9. Ensaio de proliferação celular.....	27
	10. Detecção da expressão de citocinas.....	27
	11. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para citocina.....	30
	12. Análise estatística.....	30
IV.	RESULTADOS.....	31
	1. Resposta proliferativa de linfócitos de pacientes com doença periodontal após a estimulação com antígenos de periodontopatógenos.....	32
	2. Antígenos de periodontopatógenos induzem a produção de IL-10 e IFN- γ por células T de pacientes com doença periodontal.....	32
	3. Uma grande percentagem da população de células T sanguíneas de pacientes com doenças periodontais co-expressam PD-1 e CTLA-4.....	35
	4. Pacientes com doença peridontal apresentam um leve aumento na percentagem de células T sanguíneas expressando CD69 e CD45RO.	36
	5. O desafio com antígenos de <i>A. actinomycetemcomitans</i> e <i>P. gingivalis</i> induz a expressão de PD-1 e CTLA-4 por linfócitos T sanguíneos.....	39
	6. Antígeno de <i>Porphyromonas gingivalis</i> induz a expressão de CD69 em linfócitos T CD4 ⁺ de pacientes com periodontite crônica	42
	7. O papel da via PD-1/PD-L na ativação de linfócitos T sanguíneos de pacientes com doenças periodontais.....	44

8.	Linfócitos T representam a principal população de leucócitos isolados das lesões de pacientes com periodontite crônica.....	47
9.	Alta percentagem de linfócitos isolados das lesões de pacientes com periodontite crônica expressam PD-1 e CTLA-4.....	49
10.	Alta percentagem de linfócitos isolados das lesões de pacientes com periodontite crônica expressam CD69, CD45RO e CD62L.....	51
11.	Expressão diferencial de citocinas entre lesões periodontais de pacientes com gengivite e periodontite crônica.....	53
V	DISCUSSÃO.....	54
VI	CONCLUSÕES.....	65
VII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

Introdução

As doenças periodontais (DPs) são definidas por alterações patológicas que ocorrem nos tecidos de proteção e sustentação dos órgãos dentais, tendo como principal agente etiológico as bactérias presentes no biofilme dental. Algumas centenas de espécies bacterianas colonizam a cavidade oral e, conseqüentemente, a superfície dentária e o sulco gengival. Com isso, mesmo em condições clínicas de saúde, os tecidos periodontais estão em confronto contínuo com microrganismos potencialmente patogênicos. Como há uma grande quantidade de produtos microbianos no sulco gengival, o tecido conjuntivo adjacente é densamente povoado por células e mediadores inflamatórios. Desequilíbrios na regulação das células de defesa e alterações na microbiota bacteriana podem resultar no aparecimento dos sinais clínicos de doença (Genco, 1992; Lamster, 1992).

Em termos epidemiológicos, as doenças periodontais atingem quase a totalidade da população em diferentes graus de severidade. A persistência da doença pode levar ao comprometimento da função estomatognática e representa uma das principais causas de perda dentária em adultos (AAP, 1996; AAP, 1998; Armitage, 1999). Um conceito que atualmente tem recebido grande atenção é que a ação dessas doenças não se restringe exclusivamente à cavidade oral. As doenças periodontais, em especial quando associadas ao biofilme dentobacteriano, podem influenciar sistemicamente a saúde dos pacientes, aumentando a predisposição e a ocorrência de doenças cardiovasculares, nascimento prematuro, diabetes mellitus, pneumonia bacteriana, e até mesmo a morte (Meyer e Fives-Taylor, 1998; Beck *et al.*, 1999; Hujoel *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Loos *et al.*, 2000; Soikkonen *et al.*, 2000; Fowler *et al.*, 2001; Shimazaki *et al.*, 2001; Terpenning *et al.*, 2001). Com isso, as doenças periodontais têm se tornado um problema de saúde pública.

Embora a presença de microrganismos periodontopatogênicos seja fundamental para o início e desenvolvimento da doença, tem-se mostrado que a amplificação e progressão desse processo são altamente dependentes da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro em resposta às bactérias ou a seus produtos (Kinane e Lappin, 2001; Teng, 2003; Gemmell e Seymour, 2004).

Mesmo que tal resposta supostamente proteja o hospedeiro da invasão microbiana, a relativa inacessibilidade dos leucócitos e de fatores antimicrobianos aos microrganismos no sulco gengival, somada à proteção conferida por sua organização na forma de biofilme, inviabilizam a eliminação dos agentes infecciosos (Ebersole e Taubman, 1994; Page, 1998; Ebersole *et al.*, 2001; Socransky e Haffajee, 2002; Sbordone e Bortolaia, 2003).

A forma mais prevalente destas doenças é a gengivite, que se caracteriza por alterações inflamatórias limitadas ao periodonto de proteção, sendo clinicamente representada por mudanças de contorno, edema e vermelhidão do tecido gengival, assim como sangramento espontâneo ou à sondagem. No entanto, a gengivite limita-se aos tecidos moles adjacentes ao dente, não alcançando áreas mais profundas do periodonto, como o osso alveolar, com isso a remoção do biofilme dentobacteriano e, conseqüentemente, o agente agressor, favorece a resolução da doença sem gerar seqüelas para o paciente (Lehner *et al.*, 1974; Page e Schroeder, 1976; Armitage, 1999; Albandar, 2002).

Outra manifestação das doenças periodontais é a periodontite. Além das alterações inflamatórias apresentadas pela gengivite, a característica marcante desta doença é a destruição de tecido periodontal de suporte (osso alveolar, inserção conjuntiva e ligamento periodontal), que em casos mais avançados pode levar à perda

da função e do elemento dentário. Entretanto, mesmo após a remoção do agente agressor, seqüelas causadas por essa doença somente serão corrigidas por procedimentos cirúrgico regenerativos.

Vários trabalhos têm demonstrado que a gengivite antecede a periodontite (Saxe *et al.*, 1967; Page e Schroeder, 1981; Lindhe *et al.*, 1985; Kornman *et al.*, 1997; Albandar, 2002) e, como mencionado anteriormente, a presença de microrganismos patogênicos no biofilme é necessária para a iniciação e a progressão das doenças periodontais (Albandar, 2002). Entretanto, é impossível prever quais indivíduos ou sítios periodontais com gengivite irão progredir para quadros de periodontite (Clark e Loe, 1993). Embora o acúmulo e a maturação do biofilme dentobacteriano induza o desenvolvimento de um processo inflamatório nos tecidos periodontais, o início, a duração e as características desse processo variam também entre os sítios periodontais de um mesmo indivíduo. Essas variáveis se relacionam com o fato de que apenas alguns sítios com inflamação gengival são susceptíveis à destruição óssea causada pela infecção periodontal (Albandar *et al.*, 1997; Albandar *et al.*, 1998; Oliver *et al.*, 1998; Albandar, 2002). Entretanto, vários trabalhos têm demonstrado que a reabsorção óssea periodontal observada na periodontite é altamente dependente da produção de mediadores inflamatórios pelas células do hospedeiro em resposta às bactérias ou a seus produtos metabólicos (Wiebe *et al.*, 1996; Gemmell *et al.*, 1997; Gemmell *et al.*, 2001a; Seymour e Gemmell, 2001; Garlet *et al.*, 2004; Gemmell e Seymour, 2004; Garlet *et al.*, 2006).

As doenças periodontais diferem da maioria das outras infecções por não serem causadas por uma única bactéria, mas por um grupo de bactérias. Embora mais de 500 espécies bacterianas possam ser isoladas da cavidade oral, apenas uma pequena fração

tem potencial para causar a destruição óssea periodontal. Entre as espécies mais relacionadas com esse quadro estão *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* (Ooshima *et al.*, 2003; Tietze *et al.*, 2006; Sakai *et al.*, 2007). Muitos microorganismos, em particular as espécies *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, possuem a capacidade de invadir os tecidos periodontais e estabelecer uma infecção (Schenkein, 2006). A microbiota relacionada com as doenças periodontais induz uma resposta imunológica altamente complexa e multifatorial, cujos componentes celulares desempenham um papel direto contra os microorganismos (Genco, 1992; Madianos *et al.*, 2005; Tietze *et al.*, 2006).

Durante o desenvolvimento da resposta imune no periodonto, as primeiras células a entrarem em contato com os microorganismos são as células epiteliais que compõem o epitélio juncional, o epitélio do sulco e o epitélio oral. Estas atuam como barreira física impedindo a invasão do microorganismo e secretam uma gama de peptídeos antimicrobianos, como β -defensinas e catelicidina (LL-37) (Marshall, 2004; Dale e Fredericks, 2005). As células epiteliais após a interação com o agente agressor têm um papel importante no desenvolvimento da resposta imune por produzirem CXCL8 (IL-8), uma quimiocina que dirige a migração de leucócitos para o sítio da infecção (Yoshimura *et al.*, 1987; Silva *et al.*, 2007). De fato, os leucócitos polimorfonucleares (PMN) são as primeiras células a migrarem em direção ao foco inflamatório, compondo a primeira linha de defesa do hospedeiro contra a infecção microbiana. Porém, o equilíbrio na sua atividade é essencial para a manutenção da saúde periodontal, estudos revelam que a hiperatividade ou a deficiência na atividade dessas células são associadas a manifestações severas de periodontite (Attstrom, 1975; Del Fabbro *et al.*, 2000; Waddington *et al.*, 2000)

À medida que a infecção se estabelece, células epiteliais da camada basal, fibroblastos e células endoteliais produzem CCL2 (MCP-1), uma quimiocina que induz a migração de macrófagos para o sítio da infecção (Tonetti *et al.*, 1994; Yu e Graves, 1995; Silva *et al.*, 2007). Nas doenças periodontais, os macrófagos são encontrados em número substancial tanto na gengivite como na periodontite crônica e possuem um importante papel na eliminação dos patógenos e na produção de mediadores pro-inflamatórios, como IL-1 e TNF- α , que auxiliam a resposta imune (Baker, 2000; Kinane e Lappin, 2001; Graves e Cochran, 2003). Adicionalmente, os macrófagos também apresentam um papel importante no desenvolvimento da resposta imune por apresentarem antígenos para os linfócitos T. Com isso, especula-se a respeito de uma possível falha na ativação dos macrófagos nas doenças periodontais (Chapple *et al.*, 1998; Lappin *et al.*, 1999), o que poderia influenciar o perfil de ativação das células T durante o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva.

No decorrer do processo inflamatório, o infiltrado vai se tornando cada vez mais complexo com a migração de linfócitos T e B. A produção de CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES) e CCL3 (MIP-1 α) por fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, osteoblastos e mastócitos (Gemmell *et al.*, 2001a; Kabashima *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2004; Wright e Friedland, 2004) favorece a migração de monócitos e células Th1 (do inglês T helper) para o local da infecção (Sallusto *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2007), enquanto, a produção de CCL22 (MDC), CCL17 (TARC) são capazes de atrair células Th2 (Sallusto *et al.*, 1998; Gu *et al.*, 2000) e CXCL13 (BCA-1) de quimioatrair células B (Silva *et al.*, 2007). Neste contexto, as quimiocinas possuem uma ação fundamental no recrutamento de leucócitos para o sítio da infecção e apresentam um papel importante no direcionamento do tipo de resposta imune que será desenvolvida, por determinar os subgrupos de leucócitos que irão compor o infiltrado inflamatório

(Gemmell *et al.*, 2002; Gemmell e Seymour, 2004).

Uma das possíveis vias de regulação da resposta inflamatória nas DPs seria a produção de citocinas pelas diferentes subpopulações de linfócitos T auxiliares (Th), que atuam atenuando ou potencializando a reação inflamatória nos tecidos periodontais e desta forma, determinando a atividade ou latência das DPs (Baker *et al.*, 2001; Berglundh *et al.*, 2002; Teng, 2003; Yamazaki *et al.*, 2003; Gemmell e Seymour, 2004). As respostas mediadas por linfócitos Th podem exibir um padrão Th1, que consiste predominantemente de uma resposta imune celular e pró-inflamatória, ou um padrão do tipo Th2, com características anti-inflamatórias e de resposta imune predominantemente humoral.

A polarização de linfócitos “naive” para um padrão Th1 é dependente da produção de IL-12 por células apresentadoras de antígeno, especialmente pelas células dendríticas. Além de determinar uma resposta imune adaptativa do tipo celular, a IL-12 induz a produção de IFN- γ por células NK, células dendríticas e macrófagos, sendo um importante fator de regulação da resposta imune inata (Bastos *et al.*, 2004). Contudo, estudos recentes demonstram que na ausência de IL-12, outras citocinas como a IL-23 (pertencente à família da IL-12) ou a IL-18 também são capazes de induzir a produção de IFN- γ e a polarização de linfócitos Th1 (Nakanishi *et al.*, 2001; Brombacher *et al.*, 2003; Szabo *et al.*, 2003).

IFN- γ apresenta diversos efeitos no sistema imune, sendo a principal citocina ativadora de macrófagos, estimulando a fagocitose, captação e apresentação de antígenos, produção de citocinas inflamatórias e mediadores antimicrobianos, como o óxido nítrico (NO) (Bogdan, 2000; Bogdan, 2001; Szabo *et al.*, 2003). Desta forma, no desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1, que apresenta um papel crítico na

imunidade protetora contra diversos patógenos intracelulares, a IL-12 atua basicamente como indutora da polarização, enquanto o IFN- γ pode ser considerado a citocina efetora desse padrão de resposta imune (van der Veen, 2001; Cooper *et al.*, 2002; Chakravorty e Hensel, 2003).

Com relação às DPs, IFN- γ têm sido identificado em lesões periodontais e considerado como um fator potencialmente envolvido na patogênese da doença (Roberts *et al.*, 1997; Tokoro *et al.*, 1997; Lappin *et al.*, 2001; Ukai *et al.*, 2001; Berglundh *et al.*, 2002). IFN- γ parece ser a principal citocina produzida por células T nas DPs, e diversos estudos têm demonstrado uma associação entre IFN- γ e lesões progressivas ou formas mais severas de DP (Ebersole e Taubman, 1994; Roberts *et al.*, 1997; Salvi *et al.*, 1998; Sigusch *et al.*, 1998; Kawai *et al.*, 2000; Takeichi *et al.*, 2000; Ukai *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2003). Nesse sentido, dados recentes demonstram que pacientes com periodontite agressiva (de caráter mais severo e de progressão mais rápida) apresentam uma resposta predominante do tipo Th1, com intensa expressão de IFN- γ , correlacionada com uma intensa expressão de MMPs e RANKL (Garlet *et al.*, 2003; Garlet *et al.*, 2004). Em concordância com tais resultados, estudos demonstram que o IFN- γ leva a um aumento de responsividade de fibroblastos gengivais a ação do LPS, gerando a uma maior produção de citocinas inflamatórias (Tamai *et al.*, 2002; Mochizuki *et al.*, 2004). Além disso, IFN- γ está associado à diminuição na síntese de colágeno e ao aumento na síntese de MMPs por fibroblastos gengivais *in vitro* (Martelli-Junior *et al.*, 2003). De fato, a inoculação de *Porphyromonas gingivalis* em animais geneticamente deficientes de IFN- γ resulta em uma menor reação inflamatória e reabsorção óssea (Baker *et al.*, 1999a), sugerindo um importante papel de IFN- γ na potencialização da severidade da DP. Ao contrário, certos estudos têm sugerido que altos níveis de IFN- γ no tecido gengival

estariam envolvidos na atenuação da severidade da doença (Yamazaki *et al.*, 1995; Gemmell *et al.*, 1997; Gemmell e Seymour, 1998; Bartova *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2000; Petit *et al.*, 2001). Tal hipótese encontra suporte em trabalhos que demonstram que IFN- γ está associado à redução na diferenciação e ativação de osteoclastos, principalmente *in vitro* (Moriyama *et al.*, 2002; Takayanagi *et al.*, 2002; Udagawa, 2003)

Além de atuar na determinação da severidade da doença, IFN- γ está potencialmente envolvido no controle da infecção periodontal, uma vez que tal citocina estimula fibroblastos gengivais a produzirem NO (Kendall *et al.*, 2000; Daghighi *et al.*, 2002), potencialmente envolvido no controle de microrganismos no microambiente periodontal (Kendall *et al.*, 2001; Rausch-Fan e Matejka, 2001). Contudo, apesar das evidências sugestivas da participação de IFN- γ na patogênese das DPs, seu real papel na modulação da severidade da doença e no controle da infecção periodontal, assim como os mecanismos envolvidos em tais funções, permanecem desconhecidos.

Além de mediadores de respostas do tipo Th1, citocinas envolvidas em respostas Th2 têm sido identificadas em lesões periodontais e também estão potencialmente envolvidas na patogênese da doença (Yamazaki *et al.*, 1995; Gemmell *et al.*, 1997; Gemmell e Seymour, 1998; Bartova *et al.*, 2000; Petit *et al.*, 2001). A polarização de células Th2 é dependente da produção de citocinas como IL-4, e em alguns casos IL-13 (Nelms *et al.*, 1999; Murphy e Reiner, 2002; Agnello *et al.*, 2003; Jarnicki e Fallon, 2003; Zhou e Ouyang, 2003; Stetson *et al.*, 2004; Wynn, 2004). Uma vez polarizadas, as células Th2 expressam preferencialmente receptores de quimiocinas como CCR4 e CCR8, (tornado-as responsivas a quimiocinas como CCL1 e CCL22) (Hamilton *et al.*, 2004; Rot e von Andrian, 2004), e se tornam competentes para produzir citocinas

características do padrão Th2, como IL-4 e IL-10 (Nelms *et al.*, 1999; Pestka *et al.*, 2004).

IL-4 é uma citocina pleiotrópica produzida principalmente por células Th2, que pode exercer efeitos estimulatórios ou supressivos em diferentes tipos celulares. As propriedades supressoras e anti-inflamatórias de IL-4 são em grande parte devidas a sua capacidade de inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias e IFN- γ , impedindo, dessa forma, a polarização de células Th1 (Hamilton *et al.*, 1999; Nelms *et al.*, 1999; Agnello *et al.*, 2003). IL-4 também pode agir amplificando respostas do tipo Th2 através da expressão de quimiocinas que levam ao recrutamento outras células Th2 (Hamilton *et al.*, 2002; Yamashita e Kuroda, 2002; Rot e von Andrian, 2004), ou estimulando a produção de outras citocinas que podem atuar de forma complementar ou sinérgica a IL-4 (Brubaker e Montaner, 2001; Jarnicki e Fallon, 2003; Pestka *et al.*, 2004). Uma dessas citocinas, a IL-10, também apresenta propriedades antiinflamatórias, por reduzir a expressão de moléculas co-estimulatórias em células apresentadoras de antígenos e inibindo a síntese de citocinas inflamatórias e Th1 por células T, NK e macrófagos (Hsu *et al.*, 1992; Rousset *et al.*, 1992; Moore *et al.*, 1993; Hamilton *et al.*, 1999; Pestka *et al.*, 2004). Tal citocina está geralmente associada a uma significativa redução na reação inflamatória e a produção de IL-10 pode prejudicar eliminação de agentes infecciosos levando a latência de infecções (Belkaid *et al.*, 2002; Mittrucker e Kaufmann, 2004; Sakaguchi *et al.*, 2004).

A expressão de IL-10 nos tecidos periodontais doentes foi verificada em diversos estudos, tendo normalmente sido inversamente correlacionada à produção de citocinas pró-inflamatórias e a severidade da doença (Fujihashi *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1997; Yamazaki *et al.*, 1997; Aramaki *et al.*, 1998; Gemmell e Seymour, 1998;

Lappin *et al.*, 2001). Nesse sentido, pacientes com periodontite crônica (menos grave e de progressão mais lenta) apresentam uma intensa expressão de IL-10, correlacionada a uma maior expressão de TIMPs e OPG, possivelmente envolvida na atenuação da severidade da doença (Garlet *et al.*, 2003; Garlet *et al.*, 2004). Dados provenientes de modelos experimentais de DP suportam tal hipótese, demonstrando que a ausência de IL-10 leva a uma maior reabsorção óssea alveolar (Sasaki *et al.*, 2000; Al-Rasheed *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 2004), e que células Th2 apresentam papel protetor com relação à severidade da doença (Eastcott *et al.*, 1994). Entretanto, enquanto alguns estudos demonstram que os níveis de IL-10 parecem aumentar após o tratamento periodontal (Cutler *et al.*, 2000; Gorska *et al.*, 2003; Goutoudi *et al.*, 2004), outros estudos demonstram uma maior concentração desta citocina nos sítios apresentando doença ativa e uma diminuição em seus níveis após a terapia periodontal (Gamonal *et al.*, 2000). Dessa forma, assim como acontece com as demais citocinas anteriormente citadas, os reais papéis de IL-4 e IL-10 na determinação da severidade da DP e no controle da infecção periodontal, assim como os mecanismos moleculares envolvidos em sua função, permanecem pouco conhecidos.

Apesar das inúmeras controvérsias anteriormente citadas, fica evidente o papel central dos linfócitos e seus produtos de secreção no desenvolvimento das DPs. Contudo, embora a apresentação das doenças periodontais tenha sido relacionada com o tipo e a intensidade da resposta imune do hospedeiro e ativação das células T, recentemente foi descrito que os linfócitos de pacientes com doenças periodontais usualmente apresentam hipo-responsividade a vários antígenos, incluído antígenos bacterianos (Ivanyi e Lehner, 1970; Ivanyi e Lehner, 1971; Shenker *et al.*, 1982; Shenker e DiRienzo, 1984; Shenker *et al.*, 1991; Gemmell e Seymour, 1992; Kinder Haake e Lindemann, 1997; do Vale *et al.*, 2004). Os mecanismos envolvidos na

modulação desse fenômeno ainda não são completamente conhecidos, no entanto, alguns fatores, como baixa produção de IL-2 e expressão de IL-2R (Takahashi *et al.*, 1997) e distúrbios na produção de citocinas poderiam contribuir para a imunossupressão observada. Outras possíveis causas incluem: inativação funcional (anergia), inativação ou disfunção de células do sistema imune necessárias para ativação e proliferação de células Th (Kawai *et al.*, 2000), exaustão e morte celular induzida por ativação (AICD “*activation induced cel death*”) (Gamonal *et al.*, 2001; Hasebe *et al.*, 2004). Destas, a inativação funcional de células T é uma possibilidade atraente, uma vez que este é um importante mecanismo para o controle da resposta mediada por linfócitos T. De forma relevante, em algumas infecções crônicas causadas tanto por vírus, helmintos, protozoários como por bactérias, a hipo-responsividade tem sido descrita por estar associada com a inativação funcional de células T (Gomes *et al.*, 1998; Gooding *et al.*, 2003; Borkow e Bentwich, 2004; Smith *et al.*, 2004).

Para que ocorra a ativação das células T é necessário, inicialmente, o reconhecimento do antígeno específico pela interação do receptor de células T (TCR) com o MHC presente na superfície de células apresentadoras de antígenos e a transdução de um segundo sinal via moléculas co-estimulatórias (Gause *et al.*, 1997; Carreno e Collins, 2002; Cutler e Jotwani, 2004). CD28 é o principal receptor co-estimulatório presente na superfície de células T, sendo expresso constitutivamente. CTLA-4 (CD152), um homólogo do CD28, é expresso apenas em células T ativadas e, diferente de CD28, é um regulador negativo da ativação de células T.

A molécula de CD28 é uma glicoproteína homodimérica pertencente à superfamília das imunoglobulinas. Trata-se de uma molécula expressa constitutivamente na maioria dos linfócitos T e após a ativação, sua expressão pode ser

ainda maior (Turka *et al.*, 1990). É um dos principais co-receptores que promovem co-estimulação para a ativação linfocitária, especialmente em células T “naïves”, ou seja, que não tenham sido apresentadas ao antígeno (Dubey *et al.*, 1996). Adicionalmente, em células T efectoras ou de memória, a produção de determinadas citocinas, tais como IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-5 também são dependentes da co-estimulação via CD28 (Dubey *et al.*, 1996; Martins *et al.*, 2004). Com efeito, a ligação em CD28 leva ao aumento da expressão de CD40L e das cadeias α , β e γ do receptor de IL-2, além de induzir a transcrição de RNA mensageiro para IL-2, IL-4, CTLA-4, a secreção de citocinas e a proliferação celular, eventos envolvidos na ativação das células T (Sperling e Bluestone, 1996). Contudo, animais deficientes de CD28 (CD28^{-/-}) sobrevivem normalmente (Noel *et al.*, 1996; Sperling e Bluestone, 1996), embora apresentem algumas deficiências na produção de citocinas do padrão Th2, especialmente quando infectados por patógenos como o *S. mansoni* (King *et al.*, 1996). Um estudo recente demonstrou que a co-estimulação via CD28/B7 estaria envolvida na ativação do processo de reabsorção óssea periodontal no modelo experimental (Kawai *et al.*, 2000). Relatos referentes ao papel desta molécula na doença humana são provenientes apenas de análise imunohistoquímica (Gemmell *et al.*, 2001b).

Por sua vez, a molécula CTLA-4 (do inglês “citotoxic T lymphocyte antigen 4”), é uma glicoproteína pertencente à superfamília das imunoglobulinas, que apresenta alta homologia com CD28. Com efeito, seus ligantes são os mesmos: B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86). Contudo, CTLA-4 liga-se às moléculas B7 com afinidade 100 vezes maior que CD28 (Chambers *et al.*, 1996). CTLA-4 é expressa de maneira estritamente regulada, sendo detectadas apenas em uma pequena parcela de células T ativadas (Linsley *et al.*, 1992). Quando ativados, tanto linfócitos T CD4⁺ como CD8⁺ podem expressar CTLA-4. Ensaios *in vitro*, mostram que os maiores níveis de expressão de CTLA-4 podem ser

detectados depois de 48 a 72 horas de cultura na presença de anticorpo anti-CD3 e IL-2 (Chambers *et al.*, 1996).

Embora as primeiras tentativas de elucidação da importância de CTLA-4 no controle da resposta imune resultaram em achados controversos, estudos mais recentes estabeleceram claramente a importância dessa molécula como um regulador negativo da resposta imune (Waterhouse *et al.*, 1996). O bloqueio de CTLA-4, pela administração de anticorpos solúveis, leva ao aumento da resposta de células T *in vitro* (Krummel e Allison, 1995), enquanto que a ligação dessa molécula, pelo “cross-linking” com anticorpos específicos inibe a ativação de células T humanas (Krummel e Allison, 1995) e murinas (Walunas *et al.*, 1994).

A evidência definitiva da importância de CTLA-4 na manutenção da homeostasia do sistema imune foi obtida com a construção de animais geneticamente deficientes de CTLA-4 (CTLA4^{-/-}) (Waterhouse *et al.*, 1995). Esses animais apresentaram expansão policlonal de células T e desenvolveram uma doença linfoproliferativa fatal, que leva à morte em 3-4 semanas após o nascimento (Chambers *et al.*, 1996; Waterhouse *et al.*, 1996). Análises histológicas revelaram um extenso acúmulo linfocitário nos linfonodos, timo e baço, além de infiltrados focais e difusos na medula óssea, pulmão, fígado, pâncreas e coração dos animais CTLA4^{-/-}. Linfócitos extraídos do baço desses animais proliferam espontaneamente *in vitro* e expressam marcadores de ativação (Waterhouse *et al.*, 1996).

Tem sido sugerido que, fisiologicamente, o término das respostas de célula T mediado por CTLA-4 poderia facilitar a geração de células T de memória com capacidade de responder ao estímulo antigênico assim que a expressão de CTLA-4 retornasse aos índices normais (Chambers *et al.*, 1996; Waterhouse *et al.*, 1996).

Alternativamente, CTLA-4 tem sido implicada na regulação de mecanismos de anergia, baseado em observações de que o bloqueio dessa molécula em animais com TCR transgênico (DO11.10) previne a indução de anergia por peptídeos específicos (Perez *et al.*, 1997). Embora os mecanismos pelos quais CTLA-4 participa do controle da resposta imune não estejam totalmente elucidados, foi descrito que o sinal mediado por esta molécula inibe os efeitos da ligação de CD28, ou seja, bloqueia a produção de IL-2, a expressão da cadeia α do receptor de IL-2 e de CD69 e a progressão do ciclo celular (Chambers *et al.*, 1996; Waterhouse *et al.*, 1996). Relatos mais recentes demonstraram que a ligação de CTLA-4 leva também à produção de TGF- β , que estaria diretamente implicado na inibição da proliferação dos linfócitos (Chen *et al.*, 1998).

Muitos estudos têm sido realizados para avaliar a importância de CTLA-4 em doenças. Demonstrou-se, por exemplo, que o bloqueio da ligação de CTLA-4 *in vivo* favorece a resposta imune contra tumores (Fallarino *et al.*, 1998), a rejeição de transplantes (Lin *et al.*, 1998) e a ocorrência de doença do enxerto-versus-hospedeiro (Saito *et al.*, 1998), levando também ao agravamento de doenças auto-imunes (Luhder *et al.*, 1998). Ainda, a administração de anticorpos anti-CTLA-4 *in vitro* leva ao aumento da resposta linfoproliferativa antígeno-específica e restaura a produção de citocinas em células de camundongos infectados com *Leishmania chagasi* (Gomes *et al.*, 1998). *In vivo*, o bloqueio de CTLA-4 em camundongos, promove o estabelecimento de resposta imune mais efetiva contra nemátodos (McCoy *et al.*, 1997) e aumenta a resistência à infecção com *Leishmania donovani* (Murphy *et al.*, 1998) e com *Leishmania major* (Saha *et al.*, 1998), além de levar ao aumento da resposta a *Mycobacterium* (Kirman *et al.*, 1999).

P. gingivalis, um dos principais microorganismos relacionados com o

desenvolvimento das doenças periodontais humanas, induz a expressão de CTLA-4 em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com periodontite crônica, e é sugerido que esta molécula poderia ter um papel importante na patogênese dessa doença (Aoyagi *et al.*, 2000). Considerando este dado, juntamente com os que demonstraram que o bloqueio de CTLA-4 promove um aumento da resposta contra diferentes patógenos (Murphy *et al.*, 1998; Saha *et al.*, 1998; Kirman *et al.*, 1999; Campanelli *et al.*, 2003), parece coerente a hipótese de que CTLA-4 poderia exercer papel regulador também na periodontite humana, em associação ou não com a expressão de CD28.

Recentemente, pesquisadores têm relacionado o envolvimento de outras vias nos mecanismos de regulação da resposta imune. A molécula de PD-1 (do inglês *programmed death -1*) tem sido amplamente estudada pelo seu importante papel na inativação de células T (Ishida *et al.*, 1992; Shinohara *et al.*, 1994; Vibhakar *et al.*, 1997; Greenwald *et al.*, 2005). Semelhante a CD28 e CTLA-4, esta molécula é uma glicoproteína, porém monomérica, pertencente à superfamília das imunoglobulinas (Iwai *et al.*, 2003; Day *et al.*, 2006; Petrovas *et al.*, 2006; Trautmann *et al.*, 2006; Urbani *et al.*, 2006; Sharpe *et al.*, 2007). A sua expressão em células T é estritamente regulada, como CTLA-4, sendo detectada apenas em células T ativadas (Agata *et al.*, 1996). No entanto, sua expressão não se restringe aos linfócitos T, podendo ser encontrado tanto em linfócitos B como em monócitos ativados (Agata *et al.*, 1996). PD-1 apresenta dois ligantes, PD-L1 (B7-H2) e PD-L2 (B7-DC), que possuem padrões distintos de expressão. PD-L1 pode ser expresso em células hematopoiéticas e não-hematopoiéticas (Freeman *et al.*, 2000; Tseng *et al.*, 2001), enquanto PD-L2 se restringe aos macrófagos e células dendríticas (Ishida *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2003; Petroff *et al.*, 2003; Wiendl *et al.*, 2003). Além disso, trabalhos têm mostrado que a ação de IFN- γ

induz a expressão de PD-L1, enquanto IL-4 induz a expressão de PD-L2, sugerindo um possível papel desses ligantes na regulação da resposta Th1 e Th2 (Liang *et al.*, 2003; Loke e Allison, 2003).

Inicialmente, as primeiras tentativas de descobrir o papel de PD-1 na resposta imune geraram resultados controversos, no entanto estudos mais recentes determinaram a importância dessa molécula como regulador negativo da atividade das células T. A ligação de PD-1, pelo “cross-linking” com anticorpos específicos *in vitro*, inibiu a produção de IL-2 e a proliferação de células T (Carter *et al.*, 2002).

A importância de PD-1 na manutenção da homeostasia foi confirmada após a construção de animais geneticamente deficientes (PD-1^{-/-}) (Nishimura *et al.*, 1999; Nishimura *et al.*, 2001; Okazaki *et al.*, 2003). Esses animais desenvolveram doença auto-imune, como artrite reumatóide, glomerulonefrite e cardiopatia. Esses achados indicam a participação de PD-1 nos mecanismos de tolerância periférica. Alguns estudos clínicos têm suportado o papel regulatório de PD-1 (Prokunina *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2003). Polimorfismos no gene que codifica a molécula de PD-1 favorece o desenvolvimento de lúpus eritematoso sistêmico e aumentam o risco de desenvolvimento de diabetes auto-imune (Prokunina *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2003).

Muitos trabalhos têm sido realizados para determinar o papel de PD-1 em doenças infecciosas. O fenômeno de exaustão de células T apresentado em algumas infecções virais crônicas, tanto em humanos como em modelos experimentais, está associado ao aumento da expressão de PD-1 por células T vírus-específicas (Wherry *et al.*, 2003; Wherry e Ahmed, 2004; Klenerman e Hill, 2005; Wherry *et al.*, 2005). Estes estudos relataram que o bloqueio da via PD-1/PD-L restaura a produção de citocinas e a proliferação celular de linfócitos exaustos (Day *et al.*, 2006; Petrovas *et al.*, 2006;

Trautmann *et al.*, 2006; Urbani *et al.*, 2006). Trabalhos mais recentes têm evidenciado a participação da via de sinalização PD-1/PD-1L em infecções bacterianas. O bloqueio desta via com anticorpos específicos *in vitro* levou ao aumento da proliferação de células T antígeno-específicas e a produção de IL-2 por células T de camundongos infectados com *Helicobacter pylori* (Das *et al.*, 2006). Ainda, trabalhos recentes também mostram que *S. Mansoni* induz a anergia de células T por estimular um aumento da expressão de PD-L1 em macrófagos (Smith *et al.*, 2004). Entretanto, nenhum relato na literatura aborda o papel desta via de sinalização no controle da resposta imune durante o desenvolvimento da doença periodontal humana.

Considerando que sinais co-estimulatórios têm um efeito relevante sobre a atividade e função das células T e que o papel desses sinais não foi ainda estudado nas doenças periodontais humanas, o estudo do efeito modulador de moléculas co-estimulatórias sobre a ativação de células T poderia trazer uma importante contribuição para o entendimento da resposta inflamatória contra periodontopatógenos.

Proposição

O presente trabalho tem como objetivo principal estudar os mecanismos envolvidos em mediar a supressão da resposta imune observada em indivíduos com doenças periodontais. Especificamente, nossos objetivos foram:

- 1) Estudar o envolvimento de moléculas co-estimulatórias na resposta de células T frente à estimulação com antígenos de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*;
- 2) Caracterizar o infiltrado inflamatório de lesão de pacientes com DPs, bem como estudar a presença de citocinas e moléculas co-estimulatórias.

Material e Métodos

1. SELEÇÃO DE PACIENTES

Foram inseridos neste estudo 40 pacientes, 21 eram do sexo feminino e 19 do masculino, com idade variando de 12 a 69 anos. Para as amostras do grupo Controle foram selecionados 20 indivíduos clinicamente saudáveis, sendo 10 do sexo feminino e 10 do sexo masculino, com idades entre 12 e 44 anos. O consentimento dos indivíduos inseridos neste estudo, para participação no presente trabalho, foi obtido após a leitura da carta de informação ao paciente e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOB-USP (Processo número 115/2004). Os pacientes foram selecionados nas clínicas da Disciplina de Periodontia do Departamento de Prótese da FOB-USP e do Serviço de Urgências Odontológicas da FOB-USP. Todos os pacientes foram submetidos à anamnese, exames clínicos, periodontal e radiográfico. Todos os dentes, com exceção dos terceiros molares foram analisados quanto à profundidade e sangramento à sondagem. Foram excluídos do estudo pacientes com história médica evidenciando modificadores sistêmicos das DPs (diabetes mellitus – tipo 1 ou 2, osteoporose, desnutrição, alterações hematológicas, alterações genéticas como síndrome de Down, neutropenia familiar e síndrome de Papillon-Lefèvre); mulheres grávidas ou em fase de amamentação; pacientes que passaram por terapia antibiótica, anti-inflamatória ou hormonal nos 6 meses prévios a realização do estudo; que passaram por raspagem ou curetagem subgingival recente e fumantes (Armitage, 2004; Garlet *et al.*, 2004; Kamma *et al.*, 2004). Foram incluídos no estudo apenas os pacientes que apresentaram um mínimo de 14 dentes naturais, incluindo 10 dentes posteriores, com exceção dos terceiros molares, com ausência de fatores locais que favoreciam o acúmulo de placa (cárie, restaurações subgingivais e outros).

Os indivíduos foram divididos em três grupos, pacientes com periodontite crônica, gengivite de acordo com a classificação proposta pela Academia Americana de Periodontia (AAP, 1999), e periodontalmente saudáveis (Controle). O enquadramento dos indivíduos em cada grupo foi realizado com base em achados clínicos e radiográficos que evidenciaram o estado periodontal destes pacientes (Tabela 1) (Armitage, 2004; Papantonopoulos, 2004).

Tabela 1. Perfil Clínico

	Controle (n=20)		Gengivite (n=20)		Periodontite Crônica (n=20)	
Idade (Anos)	22,81	± 7,53	30,56	± 13,48	44,44	± 12,89
Sexo (F-M)	10	- 10	9	- 11	12	- 8
Profundidade de Sondagem (mm) (média)	2,19	± 0,37	2,35	± 0,39	3,36	± 1,10
% Sítios com sangramento a sondagem (média)	9,37	± 9,35	51,80	± 21,44	76,17	± 23,88

Os dados são apresentados em média ± SEM.

2. ESTABELECIMENTO DA CULTURA DE *A. Actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*

Amostras de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* JP2 (Aa) e *Porphyromonas gingivalis* W83 (Pg) provenientes da bacterioteca do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo foram utilizados neste trabalho. A cepa de Aa foi cultivada em meio TSA (Tryptic Soy Agar D, DIFCOTM, BD) suplementado com 0,6% de extrato de levedura (DIFCOTM, BD) e mantida em jarra de microaerofilia com aproximadamente 5 - 10% de CO₂ em estufa à 37°C por cinco dias. A cepa de Pg foi cultivada em meio Agar sangue suplementado com 1 µL/mL de menadiona, 5 µL/mL de hemina e 40 µL/mL de kanamicina e mantidas em jarra de

anaerobiose contendo 90% de N₂ e 10% de CO₂ em estufa à 37°C por 10 dias. A pureza das colônias foi confirmada por Método de Gram e por visualização em estereoscópio (Wild Heerbrugg, Switzerland, MS 23358).

3. OBTENÇÃO DOS COMPONENTES ANTIGÊNICOS UTILIZADOS COMO ESTÍMULO

Para a obtenção dos componentes antigênicos, colônias de Aa ou Pg foram coletadas, dissociadas em PBS estéril por vórtex e lavadas três vezes. Em seguida, as bactérias foram rompidas por vibração ultra-sônica a 100 W por 1 minuto em banho de gelo. Este procedimento foi repetido várias vezes, até se obter um alto grau de ruptura das bactérias, o qual foi verificado através de análise microscópica. Por último, os lisados de bactérias foram centrifugados a 12000 g por 20 minutos a 4°C para remoção das bactérias não degradadas. A dosagem de proteínas foi realizada utilizando o método de Lowry. Para a estimulação das culturas de PBMCs foi utilizadas uma concentração de 0,5 µg/mL de lisado de Aa (AaAg) ou Pg (PgAg).

4. ANTICORPOS

Foram utilizados anticorpos monoclonais conjugados a isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) ou proteína clorofil peridina (PerCP) anti: CD3 (UCHT1), CD4 (SK3), CD8 (RPA-T8 e HIT8a), CD19 (HIB19), CD28 (CD28.2), CD45RO (UCHL1), PD-1 (MIH4), CD62L (DREG-56), CD69 (FN50), CD152 (BNI3) humanos e isotipos controle de camundongos, todos provenientes da BD Biosciences (San Diego, CA, USA). Para o bloqueio da via de sinalização PD-1/PD-L, *in vitro*, foi utilizado anticorpo monoclonal de camundongo anti-PD-1 humano (192106) e o isotipo controle proveniente da R&D Systems.

5. ISOLAMENTO DE LEUCÓCITOS HUMANOS

Sangue periférico de indivíduos saudáveis e pacientes com gengivite e periodontite crônica foi obtido por punção venosa e 20 mL foram coletados em seringas estéreis contendo 20U/mL de heparina (Liquemine, Roche). Após a coleta, o sangue foi diluído em igual volume de meio RPMI e a mistura aplicada sobre gradiente Ficoll-Paque (1,077g/mL) e centrifugada a 400g por 30 minutos, à temperatura ambiente. A interface obtida composta por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foi coletada e lavada duas vezes em meio RPMI 1640. Após este procedimento, o sedimento foi re-suspenso em 1mL de RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e os leucócitos contados com o auxílio de câmara de Neubauer. A viabilidade foi determinada pela exclusão de coloração com azul de Trypan a 2%.

6. CULTURA DE LEUCÓCITOS HUMANOS

PBMCs obtidos de indivíduos controle e de pacientes com gengivite e periodontite crônica, como descrito anteriormente, foram distribuídas em placas de 24 poços (1×10^6 células/poço) e cultivadas na ausência ou presença de PHA (2 μ g/mL), antígenos de Aa (0,5 μ g/mL), ou antígenos de Pg (0,5 μ g/mL) por 96 horas em estufa umidificada a 37°C em atmosfera saturada em 5% de CO₂. As células permaneceram em cultura, por diferentes períodos de tempo, de acordo com o procedimento a ser empregado: ensaios de proliferação (96 horas), fenotipagem por citometria de fluxo (96 horas), e obtenção de sobrenadante para a dosagem de citocinas por ELISA (96 horas).

7. SEPARAÇÃO DE LEUCÓCITOS DAS AMOSTRAS DE TECIDO GENGIVAL

As amostras de tecido gengival obtidas em cirurgias de exodontia de dentes

condenados por razões periodontais ou por motivos ortodônticos foram removidas da região vestibular de dentes posteriores. Em seguida, as amostras foram armazenadas em meio gelado, fragmentadas e incubadas por 1 hora a 37°C em meio RPMI 1640 contendo 500 ug/mL de liberase. Após este procedimento, o tecido foi processado em presença de 0,05% de DNase (Sigma) usando Medimachine (BD PharMingen), por 4 minutos, como previamente descrito (Campanelli *et al.*, 2006). As células foram colhidas, lavadas e a viabilidade celular determinada por exclusão do azul de Trypan a 2%.

8. CITOMETRIA DE FLUXO PARA A ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE

A análise fenotípica de PBMC, de leucócitos isolados do tecido gengival e de células cultivadas foi realizada por citometria de fluxo conforme protocolo padrão. As células (10^6 células) foram lavadas e incubadas com soro de coelho normal diluído 2:10 em PBS (para bloquear ligações inespecíficas), por 45 minutos a 4°C. Em seguida, 1,5 µg de anticorpos específicos foram adicionados e incubados por 30 minutos a 4°C. Após a incubação com os anticorpos, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS, sendo centrifugadas a 250 g por 10 minutos e armazenadas em 100 µL de PBS formol a 4°C por, no máximo, 3 dias. Em seguida, as amostras foram adquiridas em FACScan (Becton and Dickson, San Jose, CA USA) utilizando o canal de fluorescência 1 (FL1) para os anticorpos marcados com FITC, 2 (FL2) para os marcados com PE e 3 (FL3) para os marcados com PerCP. As análises foram feitas usando programas Cell Quest (Becton and Dickson) e Win Midi os quais permitem analisar todas as células adquiridas (10.000/amostra), ou apenas determinadas populações individualizadas por janelas (“gates”) estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC),

granularidade (SSC) ou fluorescência (FL) (Campanelli *et al.*, 2003).

9. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO

Para determinar a resposta linfoproliferativa, PBMC de indivíduos controle e de pacientes com gengivite e periodontite crônica foram incubados com 1,25 μ M de CFSE (diacetato/succinimidil éster de carboxifluoresceína, Molecular Probes) em meio RPMI por 5 minutos a 37°C, lavadas (250g à 4°C por 10 minutos) e distribuídas em placas de 24 poços (1×10^6 células/poço). Em seguida, as células foram cultivadas com PHA ou antígenos bacterianos, como descrito anteriormente, na presença ou ausência de anticorpo anti-PD-1 (2 μ g/mL) ou isotipo controle. Após a cultura, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e re-suspensas em 300 μ L de RPMI. Em seguida, as células foram imediatamente adquiridas em FACScan (Becton and Dickson, San Jose, CA USA) utilizando o canal de fluorescência 1 (FL1) para CFSE. As análises foram feitas usando programas Cell Quest (Becton and Dickson) e Win Midi os quais permitem analisar todas as células adquiridas (100.000/amostra), ou apenas determinadas populações, individualizadas por janelas (“gates”) estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC), granulosidade (SSC) ou fluorescência (FL).

10. DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS

10.1 Extração de RNA e transcrição reversa. A extração do RNA total foi realizada com o reagente Trizol, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante (Invitrogen Life Technologies, EUA). Brevemente, após a coleta de cada amostra, estas foram fragmentadas com o auxílio de um bisturi e, em seguida, adicionou-se o reagente Trizol (na proporção de 1mL de Trizol para cada 1mg de tecido). Para cada mL da suspensão foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio (Sigma), sendo as amostras centrifugadas a 12000g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um

tubo novo e adicionado o mesmo volume de isopropanol, para precipitação do RNA. Novamente, os tubos foram centrifugados a 12000g por 15 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado em etanol 100%, sendo então seco a temperatura ambiente. As amostras de RNA foram suspensas em 50µL de água deionizada e livre de RNase e armazenadas a -70°C, até o momento do uso. Uma alíquota de 5µL foi utilizada para determinar a concentração de RNA/µL nas amostras, usando o aparelho GeneQuant (Pharmacia Amersham Biosciences, EUA). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado através de uma reação de transcrição reversa, com a utilização de uma transcriptase reversa (Superscript II – Invitrogen Life Technologies) utilizando 5µg de RNA.

10.2. Reações de RealTimePCR. A expressão quantitativa de genes de citocinas foi analisada através de reações de RealTimePCR, utilizando-se o sistema SYBRGreen em um aparelho ABI5700 (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). Primers adequados para tais reações foram criados a partir de seqüências de mRNA para os genes alvos, do programa Primer Express (Applied Biosystems), e se encontram descritos, assim como as propriedades de cada reação (concentração de primer utilizada, temperatura de “annealing”, temperatura de “melting”, tamanho do fragmento de amplificação) na Tabela 3. Para as reações de RealTimePCR, foram utilizados 12,5µL do reagente SYBRGreen Master Mix (Applied Biosystems; que contém o fluoróforo SYBRGreen 1; a enzima polimerase AmpliTaq Gold; DNTPs com dUTP; o fluoróforo ROX, utilizado como referência passiva para normalização dos níveis de fluorescência; e os demais componentes de tampão, já devidamente otimizados), 5µL da solução de cDNA (sintetizado como previamente descrito), 4µL de água MiliQ tratada com DEPC, e 1µL da solução contendo cada primer (1 µg/µL). A

reação de amplificação compreende basicamente 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, além de um ciclo final de vinte minutos, com temperatura crescente de 60 a 95°C, empregada para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Previamente, as reações de RealTimePCR foram otimizadas com relação as concentrações ideais de cada par de primers e temperatura de “annealing” e os produtos de amplificação também foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, corados com nitrato de prata 0,2% diluído em água bidestilada, e analisados quanto a sua especificidade através da análise em gel. O sistema utilizado realiza as reações de amplificação e detecção, e quantifica as amostras através da análise do nível de fluorescência gerado pela incorporação de nucleases fluorogênicas (SYBRGreen 1) aos produtos de amplificação durante o curso da reação. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (“cycle threshold” – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos aonde a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Todas as amostras também foram submetidas a reações para a detecção de RNA mensageiro para a beta-actina, um gene de expressão constitutiva, utilizado como controle positivo da reação de amplificação; assim como os níveis de expressão de beta-actina foram utilizados para a normalização dos níveis de expressão do gene alvo. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das seqüências dos primers utilizados.

Tabela 3. Sequências de primers e propriedades da reação.

Alvo	Sequência de Primer Forward Sequência de Primer Reverse	tA(°C)	tM(°C)	bp
TNF- α	AAGCCTGTAGCCCATGTTGT CAGATAGATGGGCTCATACC	56	79	330
IFN- γ	ATGAAATATACAAGTTATATCATG TGTTTCGAGGTCGAAGAGCATCCC	58	77	501
IL-4	GCGATATCACCTTACAGGAG TGTCCTGTGAAGGAAGCCAAC	58	82	308
IL-10	AGATCTCCGAGATGCCTTCA CCGTGGAGCAGGTGAAGAAT	58	85	307
β -actina	ATGTTTGAGACCTTCAACA CACGTCAGACTTCATGATGG	56	75	495

11. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA CITOCINAS.

A concentração de citocinas (IFN- γ , IL-10 e TGF- β) presente no sobrenadante das culturas de PBMC foi mensurada através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) utilizando-se um “Kit” comercial (BD bioscience) seguindo as recomendações do fabricante. A leitura das reações colorimétricas foi realizada a 450 nm em leitor de microplacas (EMAX, Molecular Devices corporation, Sunnyvale, CA, USA). A concentração das citocinas nos sobrenadantes analisados foi determinada a partir dos valores obtidos com a curva padrão realizada com as diferentes diluições da proteína recombinante.

12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão médio (SEM) dos resultados obtidos para cada grupo. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa InStat (INSTAT software, GraphPad, San Diego, CA). Valores de $p < 0.05$ foram considerados com indicativo de significância.

RESULTADOS

1 Resposta proliferativa de linfócitos de pacientes com doença periodontal após a estimulação com antígenos de periodontopatógenos. Relatos na literatura têm demonstrado que PBMCs de indivíduos com periodontite crônica apresentam baixa resposta proliferativa frente a antígeno de periodontopatógenos e a estimulação policlonal (Emingil *et al.*, 2001; do Vale *et al.*, 2004). Para avaliar o perfil da resposta proliferativa, PBMCs de indivíduos saudáveis e pacientes com periodontite crônica e gengivite foram isoladas, cultivadas por 96hs com antígeno de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (AaAg), *Porphyromonas gingivalis* (PgAg) ou fitohemaglobulina (PHA), para determinação do índice de proliferação em relação a ausência de estímulo por citometria de fluxo. A estimulação com PHA, um mitógeno policlonal, foi capaz de induzir uma intensa resposta tanto no grupo controle, com periodontite crônica e com gengivite em comparação ao ausência de estímulo (Figura 1). Esses resultados diferem dos resultados apresentados por Emingil *et al.* em (Emingil *et al.*, 2001), mostrando que a estimulação com PHA induz uma menor proliferação em PBMC de pacientes com periodontite crônica e agressiva em comparação as células de indivíduos saudáveis. Isso se deve, provavelmente, às diferentes metodologias empregadas. No entanto, a estimulação com AaAg ou PgAg induziu um leve aumento na resposta proliferativa de células T de pacientes com gengivite enquanto nas células dos indivíduos saudáveis e dos pacientes com periodontite crônica essa resposta foi menor ou ausente (Figura 1).

2. Antígenos de periodontopatógenos induzem a produção de IL-10 e IFN- γ por células T de pacientes com doença periodontal. Um dos possíveis determinantes de atividade da doença periodontal seria a produção de citocinas pelos linfócitos (Seymour e Gemmell, 2001). Relatos na literatura têm demonstrado que linfócitos sanguíneos

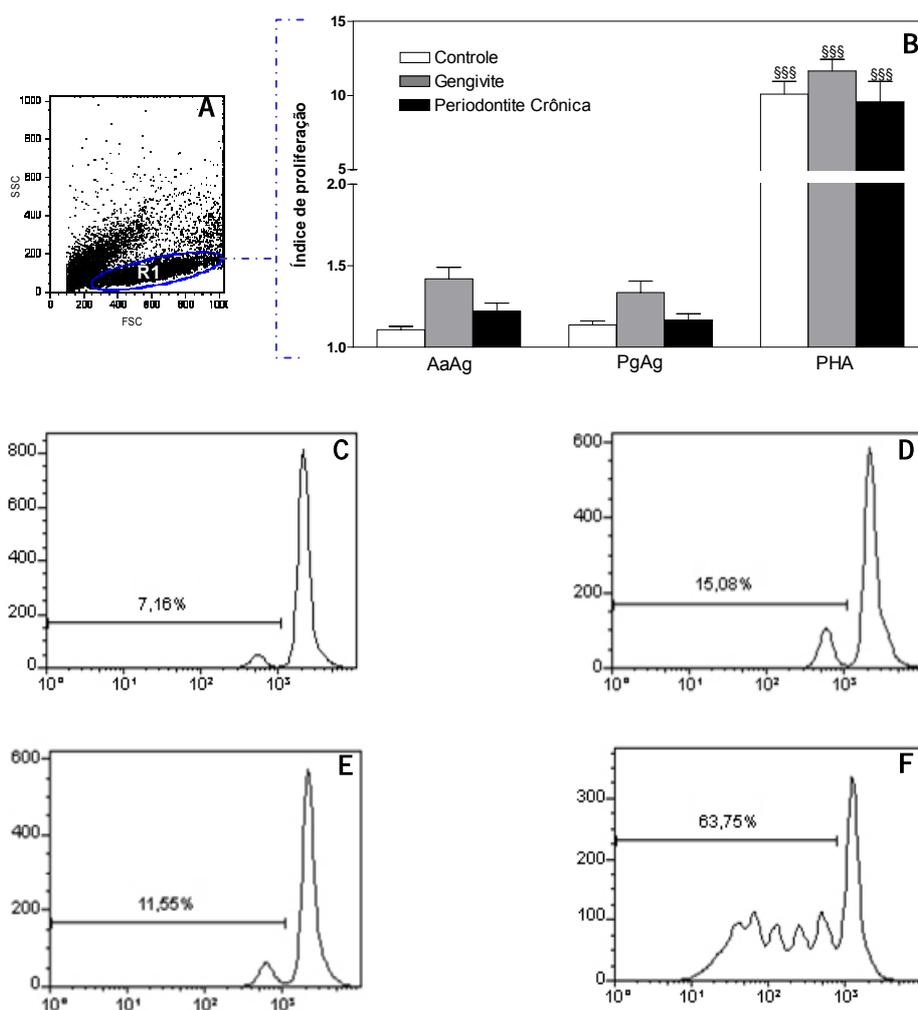


Figura 1. Resposta proliferativa de linfócitos de pacientes com doença periodontal após a estimulação com antígenos de periodontopatógenos. PBMCs isoladas de indivíduos saudáveis (Controle, $n=20$, barra aberta) e pacientes com periodontite crônica ($n=20$, barra fechada) e gengivite ($n=20$, barra cinza) foram marcadas com CFSE e cultivadas na ausência de estímulo (Meio), com antígeno de *A. actinomycetemcomitans* (AaAg) ($0,5 \mu\text{g/mL}$), *P. gingivalis* (PgAg) ($0,5 \mu\text{g/mL}$) ou PHA ($1 \mu\text{g/mL}$) por 96hs. (A) O painel mostra a gate de linfócitos (R1) de um paciente representativo. (B) Cada coluna representa o índice de proliferação de linfócitos em resposta a cada estímulo em relação ao meio. Os dados apresentados representam a média \pm SEM do resultado dos pacientes analisados individualmente. Os histogramas mostram a resposta proliferativa de um paciente representativo na ausência (Meio, C) ou na presença de AaAg (D), PgAg (E) e PHA (F). $§§§ p < 0,001$ para análise intra-grupo.

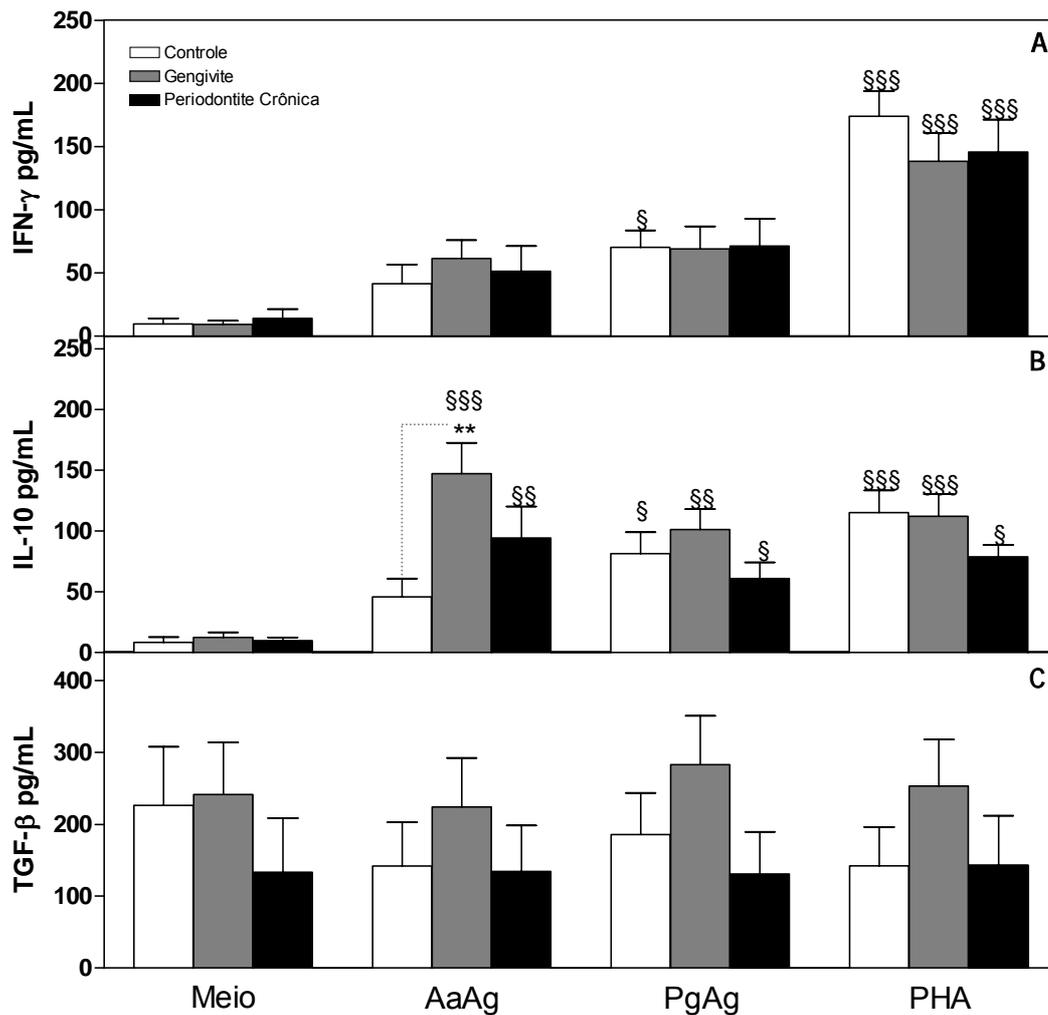


Figura 2. Antígenos de periodontopatógenos induzem a produção de IL-10 e IFN- γ por células T de pacientes com doença periodontal. PBMCs isoladas de indivíduos saudáveis (Controle, $n=20$, barra aberta) e pacientes com periodontite crônica ($n=20$, barra fechada) e gengivite ($n=20$, barra cinza) foram cultivadas na ausência de estímulo ou com antígeno de *A. actinomycetemcomitans* (AaAg) (0,5 $\mu\text{g/mL}$), *P. gingivalis* (PgAg) (0,5 $\mu\text{g/mL}$) ou PHA (1 $\mu\text{g/mL}$) por 96hs. As barras representam as concentrações de IFN- γ (A), IL-10 (B) e TGF- β (C) dos sobrenadantes das culturas de células avaliados por ELISA. Os dados apresentados representam a média \pm SEM do resultado dos pacientes analisados individualmente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ para análise inter-grupo e § $p < 0,05$; §§ $p < 0,01$ e §§§ $p < 0,001$ para análise intra-grupo comparado ao meio.

desafiados *in vitro* com antígenos de periodontopatogenos modulam a produção de citocinas (Aoyagi *et al.*, 2000; Champaiboon *et al.*, 2000; Zadeh *et al.*, 2000). Para avaliar o perfil de produção de citocinas (IFN- γ , IL-10 e TGF- β) por PBMCs de indivíduos saudáveis e de pacientes, as células foram cultivadas por 96h na presença de antígenos ou PHA. Os resultados demonstram que PHA induz marcadamente a produção de IFN- γ e IL-10 por células de pacientes doentes e de indivíduos controles. Entretanto, embora a estimulação com antígenos de Aa e Pg não induzam potentes respostas proliferativas, esses estímulos foram capazes de induzir níveis altos e similares de produção de IFN- γ por PBMCs de pacientes e indivíduos saudáveis (Figura 2A). Em relação a IL-10, os resultados mostram que a estimulação com AaAg induziu a produção dessa citocina por células de pacientes com periodontite crônica, com gengivite e indivíduos saudáveis, apresentando níveis estatisticamente mais elevados no grupo com gengivite (Figura 2B). As estimulações com PgAg induziram níveis similares de produção de IL-10 por PBMCs de pacientes e indivíduos saudáveis (Figura 2B). Em relação ao TGF- β , a estimulação com AaAg, PgAg e PHA não alterou a produção dessa citocina por PBMCs dos grupos analisados (Figura 2C).

3. Uma grande percentagem da população de células T sanguíneas de pacientes com doenças periodontais co-expressam PD-1 e CTLA-4. Uma possível disfunção nos componentes celulares do sistema imune pode estar envolvida na etiologia e patogênese das doenças periodontais. A proliferação, ativação e inibição de linfócitos T exigem o engajamento de moléculas co-estimulatórias em associação ao complexo MHC/TCR. Moléculas co-estimulatórias, tais como CD28, CTLA-4 e PD-1, participam intensamente da resposta imune, estimulando e/ou inibindo a atividade dos linfócitos T (Gause *et al.*, 1997; Carreno e Collins, 2002; Cutler e Jotwani, 2004). Porém, o

envolvimento dessas moléculas nas diferentes manifestações da doença periodontal não está bem esclarecido. Para investigar a expressão de moléculas co-estimulatórias em linfócitos sanguíneos, sangue de pacientes com periodontite crônica, gengivite e de indivíduos saudáveis foram coletados e caracterizados quanto à expressão de CD28, CTLA-4 (CD152) e PD-1. Os resultados mostram que não há diferenças significantes entre a percentagem de linfócitos T (CD3⁺), T CD4⁺, T CD8⁺ e células B (CD19⁺) no sangue periférico de pacientes com periodontite crônica, gengivite e indivíduos sadios (Figura 3). Em relação à expressão de CD28, a percentagem de linfócitos T CD4⁺CD28⁺ e T CD8⁺CD28⁺ sanguíneos foi alta, em ambos os grupos estudados (Figura 4C). Em relação à expressão de CTLA-4, a percentagem de linfócitos T CD4⁺CTLA-4⁺ foi baixa, alcançado níveis inferiores a 2% (Figura 4D). Entretanto, a percentagem de células T CD8⁺CTLA-4⁺ foi maior no grupo com gengivite (8,13 ± 1,85%) e com periodontite crônica (6,27 ± 1,30%) em comparação ao grupo controle (4,35 ± 1,46%) (Figura 4D). A expressão de CTLA-4 foi maior na população de células T CD8⁺ do que nas células T CD4⁺ em todos os grupos analisados, sendo mais evidente no grupo com periodontite crônica (Figura 4D). Em relação à expressão de PD-1, a percentagem de linfócitos T CD4⁺ positivas para essa molécula foi maior no grupo com periodontite crônica (5,62 ± 1,75%) e no grupo com gengivite (4,80 ± 0,72%) em relação ao controle (2,83 ± 0,71%) (Figura 4E). Este mesmo perfil foi observado nas células T CD8⁺PD-1⁺ porém em proporções menores (Figura 4E). Estes resultados indicam que a expressão de PD-1 pode estar envolvida na ausência de resposta proliferativa de células T de pacientes com periodontite crônica.

4. Pacientes com doença peridontal apresentam um leve aumento na percentagem de células T sanguíneas expressando CD69 e CD45RO. Para investigar a expressão

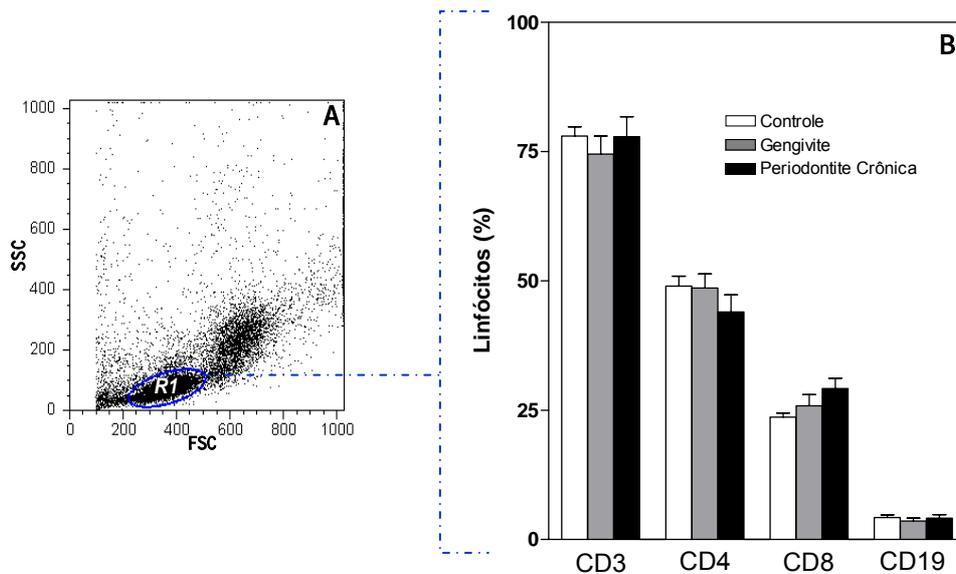


Figura 3. Caracterização fenotípica de PBMC de pacientes com doença periodontal. PBMCs isoladas de indivíduos saudáveis (Controle, $n=20$, barra aberta) e pacientes com periodontite crônica ($n=20$, barra fechada) e gengivite ($n=20$, barra cinza) foram caracterizadas por citometria de fluxo. Os dados apresentados representam a média \pm SEM do resultado dos pacientes analisados individualmente. (A) O painel mostra a gate de linfócitos (R1) de um paciente representativo. (B) Cada coluna representa a percentagem de células dentro da gate de linfócitos (R1) que expressam: CD3, CD4, CD8 e CD19. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$: Teste de Tukey.

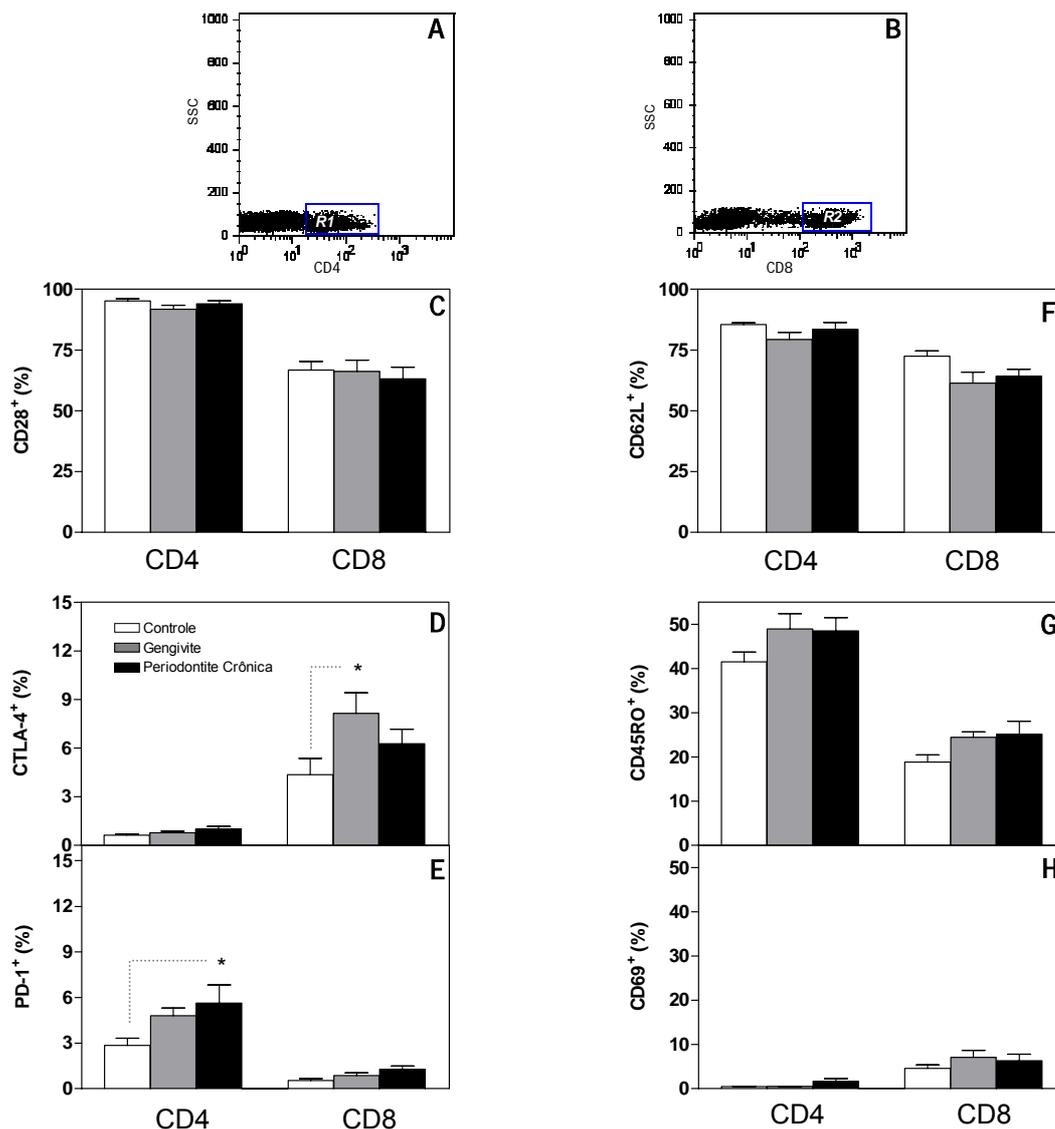


Figura 4. Uma grande porcentagem da população de células T sanguíneas de pacientes co-expressam PD-1 e CTLA-4. PBMCs isoladas de indivíduos saudáveis (Controle, $n=20$, barra aberta) e pacientes com periodontite crônica ($n=20$, barra fechada) e gengivite ($n=20$, barra cinza) foram caracterizadas por citometria de fluxo. Os dados apresentados representam a média \pm SEM do resultado dos pacientes analisados individualmente. (A) O painel mostra a gate de linfócitos CD4⁺ (R1) de um paciente representativo. (B) O painel mostra a gate de linfócitos CD8⁺ (R2) de um paciente representativo. Cada coluna representa a porcentagem de células T CD4⁺ ou CD8⁺ que co-expressam CD28 (C), CTLA-4 (CD152, D), PD-1 (E), CD62L (F), CD45RO (G) e CD69 (H). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$: Teste de Tukey.

de moléculas de ativação em linfócitos sanguíneos, o sangue de pacientes com periodontite crônica, gengivite e de indivíduos saudáveis foram coletados e as células caracterizadas quanto à expressão de CD62L, CD45RO e CD69. Em relação à expressão de CD62L, a percentagem de células T CD4⁺ positivas para essa molécula foi semelhante nos grupos analisados (Figura 4F). Na população de células T CD8⁺, a percentagem de células positivas para CD62L foi levemente maior no grupo controle (72,40 ± 3,29%) quando comparado com o grupo com gengivite (61,35 ± 6,71%) e periodontite crônica (64,16 ± 4,17%) (Figura 4F). Em relação à expressão de CD45RO, a percentagem de linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺ foi maior no grupo com periodontite crônica (48,49 ± 4,40%) e gengivite (48,97 ± 5,05) do que no controle (41,58 ± 3,07%) (Figura 4G). A percentagem de células T CD8⁺ positivas para CD45RO também foi levemente maior no grupo com periodontite crônica (25,12 ± 4,37%) e gengivite (24,41 ± 1,77%) quando comparado ao controle (18,83 ± 2,35 %) (Figura 2G). Quanto à expressão de CD69, a percentagem de células T CD4⁺ positivas para essa molécula foi maior no grupo com periodontite crônica (1,69 ± 0,84%) do que no grupo com gengivite (0,48 ± 0,08%) e controle (0,42 ± 0,10%) (Figura 4H). Na população de células T CD8⁺ a percentagem de células positivas para CD69 também foi semelhante nos grupos com periodontite crônica (6,36 ± 2,05%), gengivite (7,08 ± 2,36%) e controle (4,57 ± 1,18%) (Figura 4H).

5. O desafio com antígenos de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* induz a expressão de PD-1 e CTLA-4 por linfócitos T sanguíneos. Relatos na literatura têm demonstrado que linfócitos de indivíduos com periodontite crônica quando desafiados com antígenos de *P. gingivalis* elevam a expressão de CTLA-4 (Aoyagi *et al.*, 2000). Com o intuito de avaliar se a estimulação com antígenos de *A. actinomycetemcomitans*

e *P. gingivalis* modularia a expressão de moléculas co-estimulatórias, PBMCs de indivíduos saudáveis e pacientes com periodontite crônica e gengivite foram cultivadas por 96hs na presença de antígenos ou PHA. Em seguida, a expressão de CD28, CTLA-4 e PD-1 foi avaliada por citometria de fluxo. A cultura com antígenos não alterou de forma significativa a percentagem de linfócitos B (CD19⁺) e de linfócitos T (CD3⁺), assim como de células T CD4⁺ e células T CD8⁺, nos grupos analisados (dados não mostrados). Em relação a CD28, o perfil de expressão dessa molécula em linfócitos T foi similar em todos os grupos (dados não mostrados). Em relação à CTLA-4, a análise intra-grupos mostrou que a estimulação com PgAg e PHA induz significativamente a sua expressão em ambos os grupos analisados (Figura 5B e C). Entretanto a estimulação com AaAg induziu levemente a expressão de CTLA-4 em células T CD4⁺ de paciente com gengivite e de indivíduos saudáveis, sendo que esta indução foi estatisticamente significativa nas células de indivíduos com periodontite crônica em relação a ausência de estímulo (meio) (Figura 5B). Na análise inter-grupos, observou-se que a indução de CTLA-4 nas células T CD4⁺ foi levemente maior no grupo com periodontite crônica, seguido pelo grupo com gengivite após o desafio com antígenos de periodontopatógenos (Figura 5B). Nos linfócitos T CD8⁺, a estimulação com antígenos e PHA falhou em induzir a expressão de CTLA-4 em ambos os grupos tanto na análise intra-grupos como inter-grupos, exceto a estimulação com PHA que induziu a expressão de CTLA-4 em células T CD8⁺ no grupo controle a ausência de estímulo (Figura 5G e H). Com relação à PD-1, a análise intra-grupos mostrou que a estimulação com antígenos de periodontopatógenos induziu significativamente a expressão desta molécula em células T CD4⁺ no grupo com periodontite crônica em relação à ausência de estímulo (Figura 5D). A estimulação com PHA induziu significativamente sua expressão em ambos os grupos analisados em relação à ausência de estímulo (Figura 5E). Na

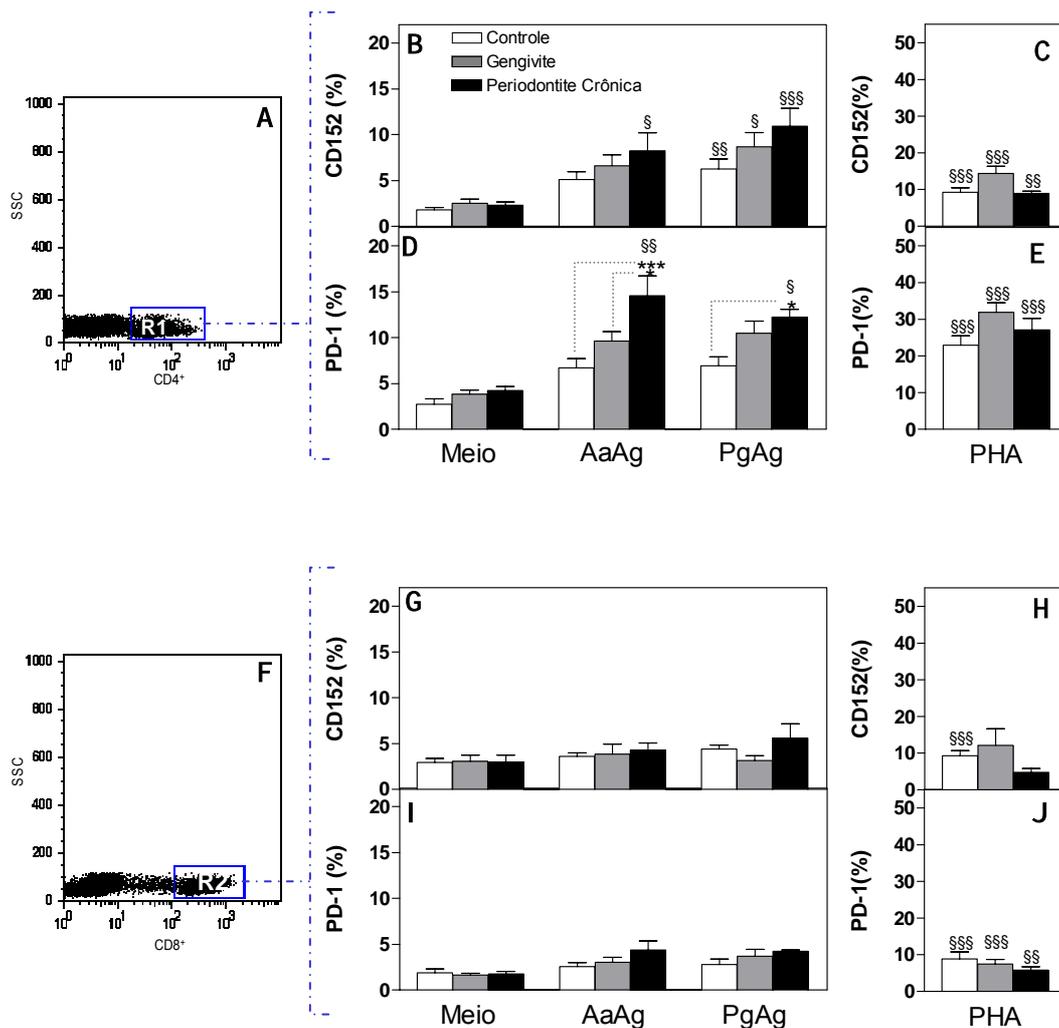


Figure 5. O perfil de expressão de moléculas co-estimulatórias em linfócitos T sanguíneos de pacientes com doença periodontal frente a antígenos de periodontopatógenos. PBMCs isoladas de indivíduos saudáveis (Controle, $n=20$, barra aberta) e pacientes com periodontite crônica ($n=20$, barra fechada) e gengivite ($n=20$, barra cinza) foram cultivadas na ausência de estímulo (Meio) ou com antígeno de *A. actinomycetemcomitans* (AaAg) ($0,5 \mu\text{g/mL}$), *P. gingivalis* (PgAg) ($0,5 \mu\text{g/mL}$) ou PHA ($1 \mu\text{g/mL}$) por 96hs. Em seguida, as células foram caracterizadas por citometria de fluxo. Os dados apresentados representam a média \pm SEM do resultado dos pacientes analisados individualmente. (A) Painel mostra a gate de linfócitos CD4^+ (R1) de um paciente representativo. Cada coluna representa a percentagem de células dentro da gate de linfócitos CD4^+ (R1) que co-expressam: CTLA-4 (CD152, B e C) e PD-1 (D e E). (F) Painel mostra a gate de linfócitos CD8^+ (R2) de um paciente representativo. Cada coluna representa a percentagem de células dentro da gate de linfócitos CD8^+ (R2) que co-expressam: CTLA-4 (CD152, G e H) e PD-1 (I e J). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ para análise inter-grupo e § $p < 0,05$; §§ $p < 0,01$ e §§§ $p < 0,001$ para análise intra-grupo comparado ao meio.

análise inter-grupos, observa-se que a estimulação com AaAg induziu uma expressão estatisticamente maior de PD-1 em células T CD4⁺ de pacientes com periodontite crônica comparada ao grupo com gengivite e controle (Figura 5D). Em relação à PgAg, o estímulo induziu uma expressão estatisticamente maior no grupo com periodontite crônica em comparação ao grupo controle, mas observou-se também uma expressão levemente aumentada no grupo com gengivite em relação com grupo controle (Figura 5D). Nos linfócitos T CD8⁺, a estimulação com antígenos de periodontopatógenos falhou em induzir a expressão de PD-1 em ambos os grupos tanto na análise intra-grupos como inter-grupo (Figura 5I). A estimulação com PHA induziu marcadamente a expressão de PD-1 em células T CD8⁺ em ambos os grupos em comparação a ausência de estímulo, no entanto não apresentou diferença estatística na comparação inter-grupos (Figura 5J).

6. Antígeno de *Porphyromonas gingivalis* induz a expressão de CD69 em linfócitos T CD4⁺ de pacientes com periodontite crônica. Com o intuito de avaliar se a estimulação com antígenos de periodontopatógenos alteraria o perfil de ativação dos linfócitos T, PBMCs de indivíduos saudáveis e pacientes com periodontite crônica e gengivite foram cultivadas por 96hs na presença de antígenos e a expressão de CD69, CD62L e CD45RO avaliada por citometria de fluxo. Os dados revelaram que a estimulação com os antígenos não alterou significativamente a expressão de CD62L por células T de pacientes e indivíduos saudáveis, tanto na análise intra-grupos quanto na análise inter-grupos (dados não apresentados). Em relação à expressão de CD69 e CD45RO, apenas a estimulação com PHA induziu significativamente a expressão desta molécula em células T CD4⁺ nos grupos analisados em relação à ausência de estímulo (Figura 6B e C), entretanto não houve diferença nesta indução entre os grupos analisados (Figura 6C). Os antígenos de periodontopatógenos falharam em induzir a

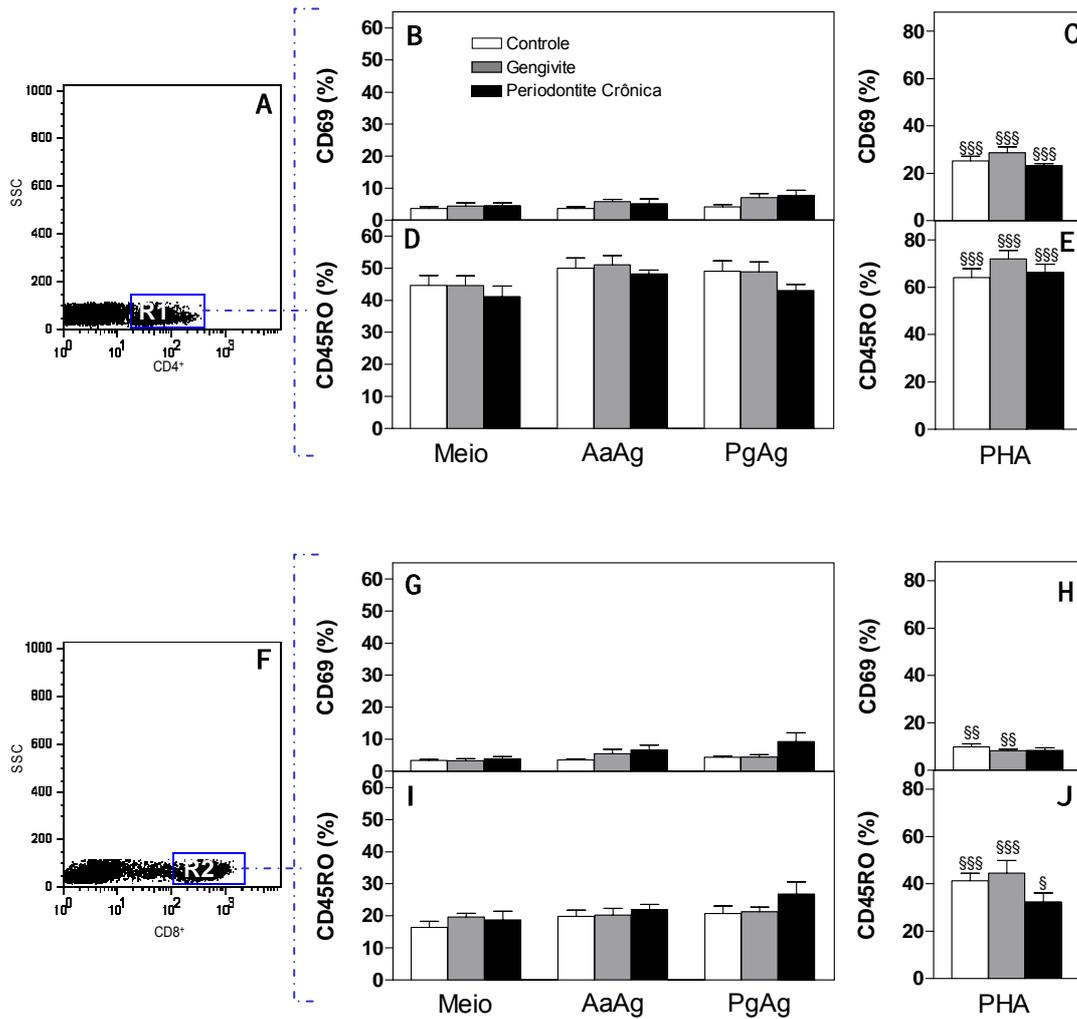


Figure 6. Análise do perfil de expressão de marcadores de ativação em linfócitos T sanguíneos de pacientes com doença periodontal frente a antígenos de periodontopatógenos. PBMCs isoladas de indivíduos saudáveis (Controle, $n=20$, barra aberta) e pacientes com periodontite crônica ($n=20$, barra fechada) e gengivite ($n=20$, barra cinza) foram cultivadas na ausência de estímulo (Meio) ou com antígeno de *A. actinomycetemcomitans* (AaAg) ($0,5 \mu\text{g/mL}$), *P. gingivalis* (PgAg) ($0,5 \mu\text{g/mL}$) ou PHA ($1 \mu\text{g/mL}$) por 96hs. Em seguida, as células foram caracterizadas por citometria de fluxo. Os dados apresentados representam a média \pm SEM do resultado dos pacientes analisados individualmente. (A) Painel mostra a gate de linfócitos CD4^+ (R1) de um paciente representativo. Cada coluna representa a percentagem de células dentro da gate de linfócitos CD4^+ (R1) que co-expressam: CD69 (B e C) e CD45RO (D e E). (F) Painel mostra a gate de linfócitos CD8^+ (R2) de um paciente representativo. Cada coluna representa a percentagem de células dentro da gate de linfócitos CD8^+ (R2) que co-expressam: CD69 (G e H) e CD45RO (I e J). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ para análise inter-grupo e § $p < 0,05$; §§ $p < 0,01$ e §§§ $p < 0,001$ para análise intra-grupo comparado ao meio.

expressão de CD69 e CD45RO em células T CD8⁺ em ambos os grupos em relação à ausência de estímulo, mas a análise inter-grupo mostrou uma expressão estatisticamente maior no grupo com periodontite crônica quando estimulado com PgAg (Figura 6G e I). Com relação à PHA, o estímulo induziu a expressão de CD69 e CD45RO em células T CD8⁺ em ambos os grupos em relação à ausência de estímulo (Figura 6H e J).

7. O papel da via PD-1/PD-L na ativação de linfócitos T sanguíneos de pacientes com doenças periodontais. Dados apresentados neste estudo mostram que antígenos de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* induzem uma alta expressão de PD-1 em células T CD4⁺ de pacientes com periodontite crônica. Entretanto, não existe relato na literatura sobre a participação da via de sinalização PD-1/PD-L na modulação da resposta imune frente à periodontopatógenos. Para avaliar a influência desta via na ativação de células T, PBMCs de pacientes com periodontite crônica e gengivite e de indivíduos saudáveis foram cultivadas com antígenos ou PHA por 96hs, na presença de anticorpo anti-PD-1 (α -PD-1) ou isotipo controle. Em seguida, o índice de proliferação foi analisado por citometria de fluxo e as concentrações de IFN- γ e IL-10 dosada por ELISA. Os resultados mostram que o bloqueio da via de sinalização PD-1/PD-L não teve efeito significativo na resposta proliferativa independente do estímulo e do grupo analisado (Figura 7). O segundo passo foi avaliar a produção de citocina após o bloqueio do PD1. Os resultados mostram que o bloqueio desta via aumentou a produção de IFN- γ por PBMCs de ambos os grupos analisados quando estimulados com antígenos de periodontopatógenos (Figura 8A, B e C). Com relação a produção de IL-10, o bloqueio de PD-1 na estimulação com AaAg diminuiu estatisticamente a produção desta citocina nos grupos com doença e falhou em modular a produção no grupo controle (Figura 8D, E e F). Controversamente, o bloqueio de PD-1 na estimulação com PgAg aumentou significativamente a produção de IL-10 nos grupos com periodontite crônica e controle, e

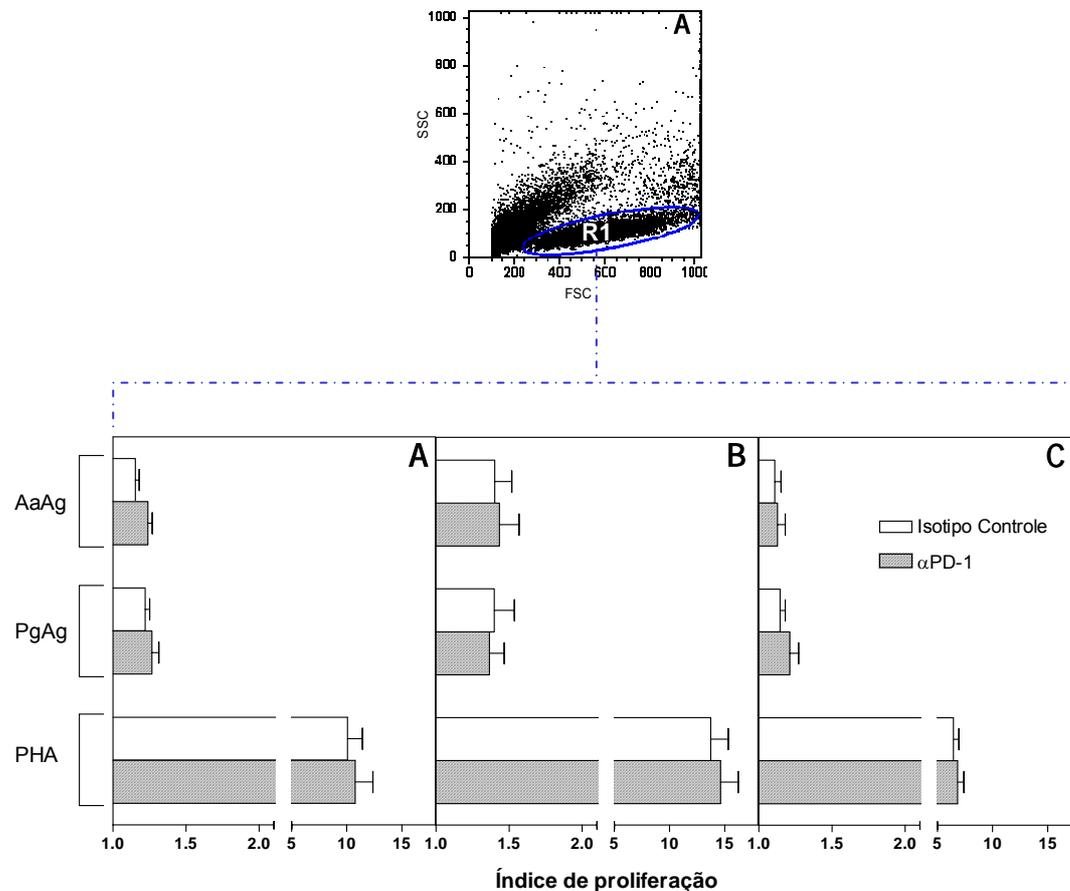


Figura 7. A influência do PD-1 na resposta de PBMCs frente a antígenos de periodontopatógenos. PBMCs isoladas de indivíduos saudáveis (Controle, $n=12$, **A**) e pacientes com periodontite crônica ($n=10$, **C**) e gengivite ($n=10$, **B**) foram marcadas com CFSE e cultivadas com antígeno de *A. actinomycetemcomitans* (AaAg) ($0,5 \mu\text{g/mL}$), *P. gingivalis* (PgAg) ($0,5 \mu\text{g/mL}$) ou PHA ($1 \mu\text{g/mL}$) por 96h na presença de anticorpo anti-PD-1 ($\alpha\text{PD-1}$) ou isotipo controle. (**A**) O painel mostra a gate de linfócitos (R1) de um paciente representativo. Cada coluna representa o índice de proliferação de linfócitos em resposta a cada estímulo em relação ao meio. As colunas representam a porcentagem de linfócitos de indivíduos saudáveis (**A**), de pacientes com gengivite (**B**) e periodontite crônica (**C**) que proliferam frente a cada estímulo. Os dados apresentados representam a média \pm SEM do resultado dos pacientes analisados individualmente. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$: Teste de Wilcoxon.

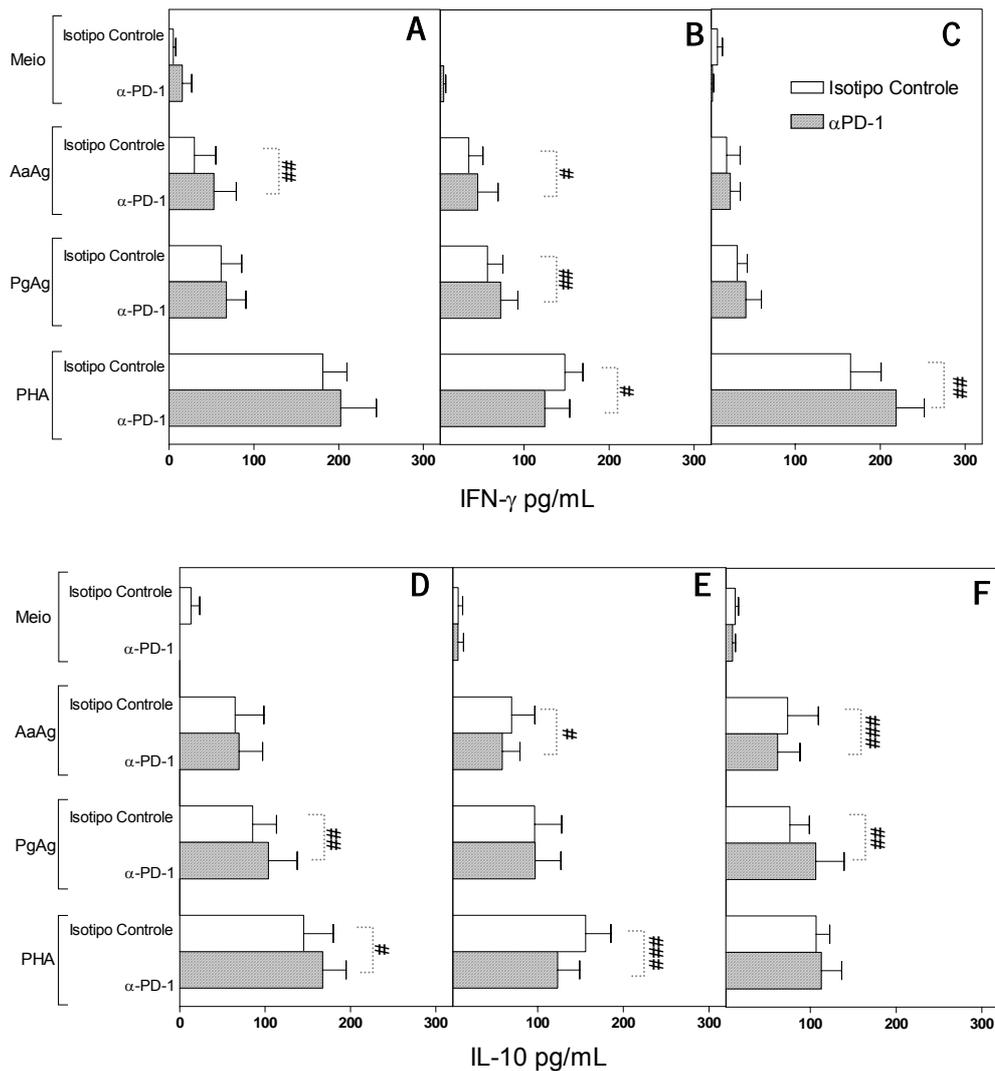


Figura 8. A influência do PD-1 na produção de citocinas por PBMCs frente a antígenos de periodontopatógenos. PBMCs isoladas de indivíduos saudáveis (Controle, $n=12$, A e D) e pacientes com periodontite crônica ($n=10$, B e E) e gengivite ($n=10$, C e F) foram marcadas com CFSE e cultivadas com antígeno de *A. actinomycetemcomitans* (AaAg) (0,5 μ g/mL), *P. gingivalis* (PgAg) (0,5 μ g/mL) ou PHA (1 μ g/mL) por 96h na presença de anticorpo anti-PD-1 (α PD-1) ou isotipo controle. Em seguida, as citocinas presentes no sobrenadante foram dosadas por ELISA. As colunas representam a concentração de IFN- γ (A-C) e IL-10 (D-F) dosadas dos sobrenadantes. Os dados apresentados representam a média \pm SEM do resultado dos pacientes analisados individualmente. # $p<0,05$; ## $p<0,01$ e ### $p<0,001$: Teste de Wilcoxon.

alhou em modular a produção no grupo com gengivite (Figura 8D, E e F). Intrigantemente, o bloqueio do PD-1 na estimulação com PHA resultou em padrões similares de produção de IFN- γ e IL-10, induzindo a sua produção por PBMC de indivíduos saudáveis e de paciente com periodontite crônica e reduzindo a sua produção no grupo com gengivite (Figura 8).

8 Linfócitos T representam a principal população de leucócitos isolados das lesões de pacientes com periodontite crônica. A presença contínua de microorganismos potencialmente patogênicos e de seus produtos metabólicos no sulco gengival leva ao acúmulo de células e mediadores inflamatórios nos tecidos adjacentes. Para determinar quantitativamente a presença de linfócitos nos sítios de infecção com periodontopatógenos, leucócitos foram isolados do tecido gengival de pacientes com periodontite crônica, gengivite e indivíduos saudáveis. Os resultados mostram que o número total de leucócitos isolados do grupo de pacientes com periodontite crônica ($3,35 \pm 1,57 \times 10^6$ células/biópsia) é estatisticamente superior aos isolados do grupo controle ($0,50 \pm 0,07 \times 10^6$ células/biópsia) e de pacientes com gengivite ($0,80 \pm 0,18 \times 10^6$ células/biópsia) (Figura 9A). O infiltrado inflamatório recuperado do tecido gengival foi composto, principalmente, por linfócitos T (CD3⁺), a sua população no grupo com periodontite crônica ($54,81 \pm 4,43\%$) foi estatisticamente superior ao grupo controle ($38,44 \pm 4,80\%$), e levemente superior ao grupo com gengivite ($46,28 \pm 5,97\%$) (Figura 9C). A população de células T CD4⁺ e CD8⁺ representam, respectivamente, $22,07 \pm 2,26\%$ e $17,38 \pm 2,76\%$ das células que compõem o infiltrado inflamatório do tecido gengival com periodontite crônica; $14,55 \pm 3,40\%$ e $17,04 \pm 3,53\%$ do tecido com gengivite; e $8,82 \pm 1,50\%$ e $11,53 \pm 2,65\%$ do tecido saudável (Figura 9C). A população de células T CD4⁺ aumenta no tecido gengival à medida que a doença evolui e esta diferença entre os grupos é estatisticamente significativa (Figura 9C). De acordo com os

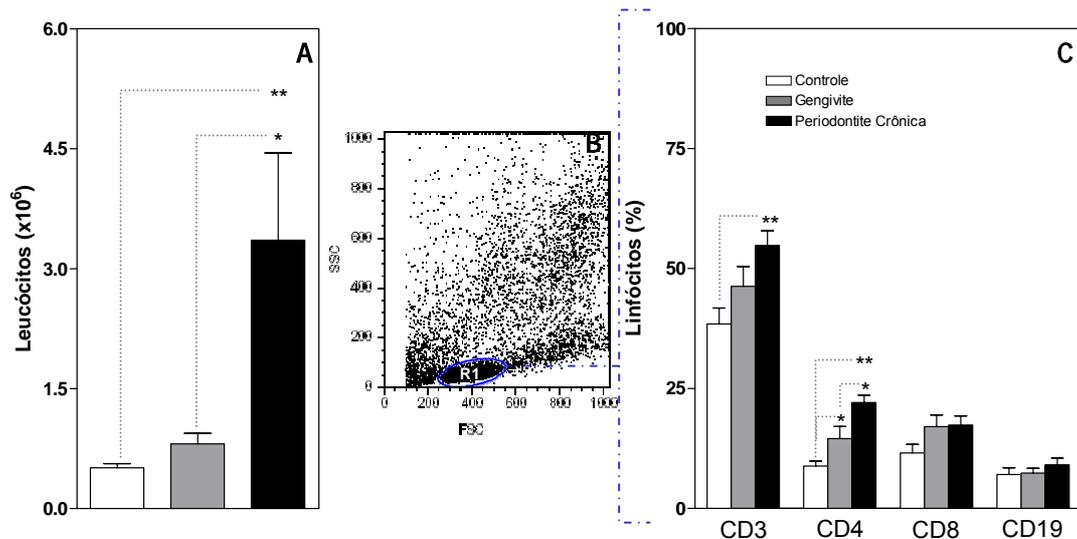


Figura 9. Caracterização dos leucócitos derivados do tecido gengival de pacientes com doença periodontal. Amostras de tecido gengival (da vestibular dos dentes posteriores) de indivíduos saudáveis (controle, $n=20$, barra aberta) e de pacientes com periodontite crônica ($n=20$, barra fechada) e gengivite ($n=20$, barra cinza) passaram por um processo de digestão enzimática com liberase e desagregação tecidual usando “Medmachine”. Em seguida, a concentração e viabilidade celular foram determinadas e, por último, as células caracterizadas por citometria de fluxo. Os dados apresentados representam a média \pm SEM do resultado dos pacientes analisados individualmente. (A) Cada coluna representa a contagem total de leucócitos recuperados do tecido periodontal. (B) O painel mostra a gate de linfócitos (R1) de um paciente representativo. (C) Cada coluna representa a percentagem de células dentro da gate de linfócitos (R1) que expressam: CD3, CD4, CD8 e CD19. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$: Teste de Tukey.

resultados, é evidente o predomínio da população de células T CD4⁺ sobre as CD8⁺ no grupo com periodontite crônica, no entanto esta relação se inverte nos grupos controle e de pacientes com gengivite. A presença de linfócitos B foi detectada em pequena quantidade nos grupos com periodontite crônica ($9,09 \pm 2,02\%$), gengivite ($7,07 \pm 1,97\%$) e controle ($7,36 \pm 1,47\%$) (Figura 9C). Os resultados mostram que existe diferença estatisticamente significativa na composição do infiltrado celular derivado do tecido gengival, além de um aumento no número total de leucócitos nas lesões com periodontite crônica.

9. Alta percentagem de linfócitos isolados das lesões de pacientes com periodontite crônica expressam PD-1 e CTLA-4. Uma vez caracterizado o infiltrado inflamatório, avaliou-se o perfil de expressão de moléculas co-estimulatórias pelas células recém isoladas dos tecidos gengivais. Os resultados revelam uma alta percentagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ co-expressando CD28 nos grupos estudados (Figura 10C). Houve um aumento progressivo na população de células T CD4⁺ positivas para CD28 à medida que analisamos as células isoladas de indivíduos saudáveis ($33,71 \pm 5,53\%$), de pacientes com gengivite ($53,41 \pm 9,52\%$) e periodontite crônica ($74,19 \pm 9,52\%$) (Figura 10C). A presença de células T CD8⁺CD28⁺ foi estatisticamente superior no grupo com periodontite crônica em comparação ao grupo com gengivite e controle (Figura 10C). A expressão de CTLA-4 e PD-1 foram detectadas em ambos os grupos, tanto na população de células T CD4⁺ quanto na população de células T CD8⁺ (Figura 10D e E). Em relação à proporção de células T CD4⁺ co-expressando CTLA-4, observou-se uma percentagem estatisticamente maior de células positivas para essa molécula no grupo com periodontite crônica ($12,11 \pm 1,70\%$) em comparação ao grupo com gengivite ($4,22 \pm 1,57\%$) e controle ($2,98 \pm 0,49$) (Figura 10D). Essa diferença se torna mais evidente nas células T CD8⁺ que co-expressam CTLA-4, na qual esta relação é de $10,41 \pm 4,20\%$ no grupo com

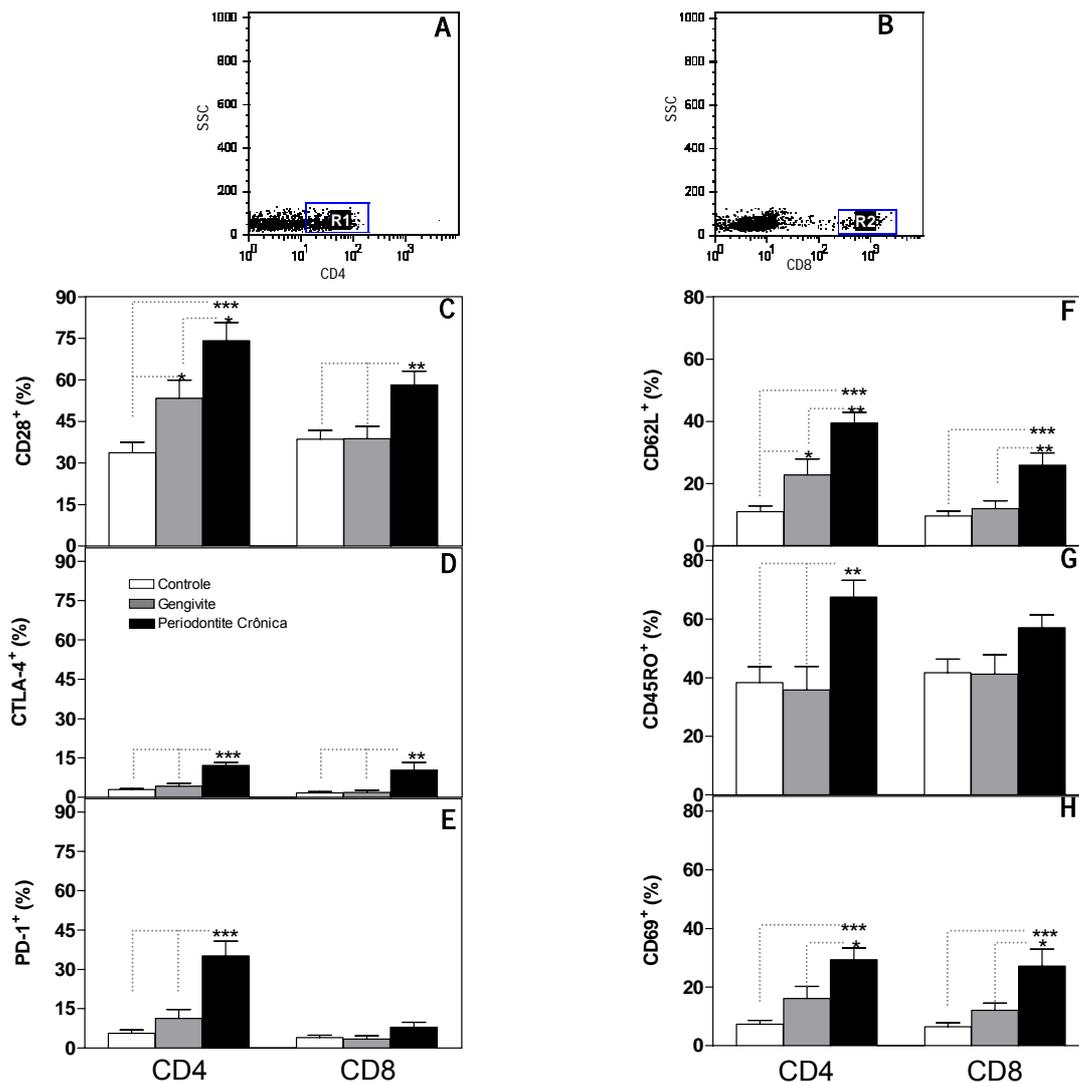


Figura 10. Expressão de moléculas de superfície em linfócitos derivados do tecido gengival de pacientes com doença periodontal. Amostras de tecido gengival de indivíduos saudáveis (controle, $n=20$, barra aberta) e de pacientes com periodontite crônica ($n=20$, barra fechada) e gengivite ($n=20$, barra cinza) passaram por um processo de digestão enzimática com liberase e desagregação tecidual usando “Medmachine”. Em seguida, a concentração e viabilidade celular foram determinadas e, por último, as células caracterizadas por citometria de fluxo. Os dados apresentados representam a média \pm SEM do resultado dos pacientes analisados individualmente. (A) O painel mostra a gate de linfócitos CD4⁺ (R1) de um paciente representativo. (B) O painel mostra a gate de linfócitos CD8⁺ (R2) de um paciente representativo. Cada coluna representa a porcentagem de células T CD4⁺ ou CD8⁺ que co-expressam CD28 (C), CTLA-4 (CD152, D), PD-1 (E), CD62L (F), CD45RO (G) e CD69 (H). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$: Teste de Tukey.

periodontite crônica, $1,91 \pm 1,18\%$ no grupo com gengivite e $1,69 \pm 0,58\%$ no grupo controle (Figura 10D). A percentagem de células T $CD4^+ PD-1^+$ presentes nos tecidos gengivais foi estatisticamente superior no grupo de periodontite crônica ($35,14 \pm 8,14\%$) comparado ao grupo de pacientes com gengivite ($11,29 \pm 4,93\%$) e controle ($5,67 \pm 1,92\%$) (Figura 10E). O perfil de células T $CD8^+$ que co-expressam PD-1 foi similar entre os grupos de pacientes com gengivite ($4,02 \pm 1,25\%$) e controle ($3,41 \pm 1,76\%$), mas apresentou um leve aumento no grupo de pacientes com periodontite crônica ($7,95 \pm 2,73\%$) (Figura 10E). A expressão de PD-1 entre as sub-populações de células T foi maior nos linfócitos $CD4^+$ do que nos $CD8^+$ em ambos os grupos, sendo mais evidente no grupo com periodontite crônica (Figura 10E).

10. Alta percentagem de linfócitos isolados das lesões de pacientes com periodontite crônica expressam CD69, CD45RO e CD62L. A expressão de marcadores de ativação (CD62L, CD45RO e CD69) também foi avaliada em linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ isolados dos tecidos gengivais. Os linfócitos T $CD4^+CD62L^+$ foram detectados em percentagens estatisticamente maiores no grupo com periodontite crônica ($39,55 \pm 4,92\%$) seguido pelo grupo com gengivite ($22,85 \pm 7,43\%$) e controle ($11,05 \pm 2,65\%$) (Figura 10F). Em relação às células T $CD8^+CD62L^+$, o grupo com periodontite crônica ($25,95 \pm 5,80\%$) apresentou uma percentagem significativamente maior no grupo com periodontite crônica em relação ao grupo com gengivite ($12,00 \pm 3,76\%$) e controle ($9,64 \pm 2,95\%$) (Figura 10F). Em relação à expressão de CD45RO, a percentagem de linfócitos T $CD4^+CD45RO^+$ foi estatisticamente maior no grupo com periodontite crônica ($67,47 \pm 8,42\%$) em comparação ao grupo com gengivite ($35,77 \pm 11,71\%$) e controle ($38,35 \pm 7,84\%$) (Figura 10G). A percentagem de células T $CD8^+CD45RO^+$ apresentou-se levemente maior no grupo com periodontite crônica ($57,06 \pm 6,32\%$) em comparação ao grupo com gengivite ($41,20 \pm 9,61\%$) e controle ($41,67 \pm 6,72\%$) (Figura 10G). Em

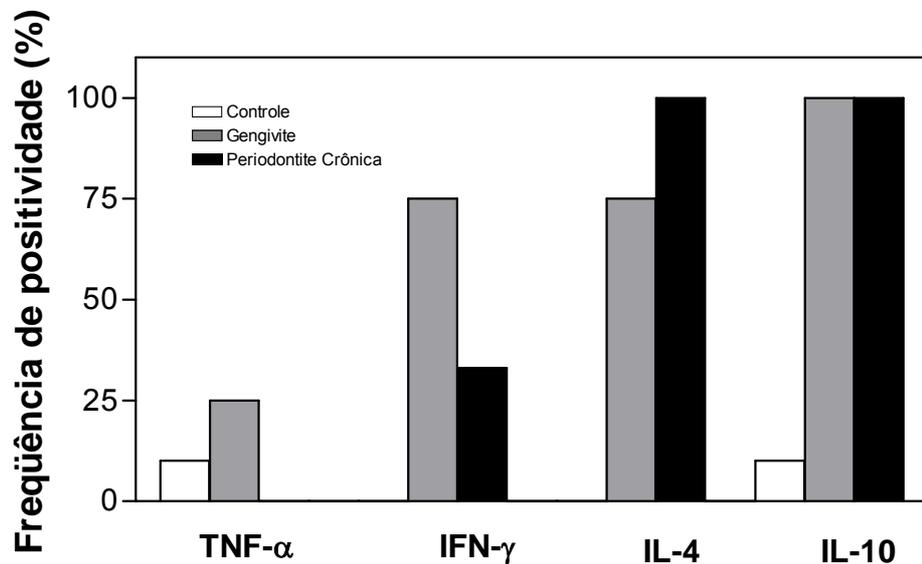


Figura 11. Frequência de detecção de TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10 em biópsias de tecido gengival de pacientes com doença periodontal. Amostras gengivais foram obtidas de pacientes com periodontite crônica (n=10, barra fechada) e gengivite (n=10, barra cinza) e de indivíduos saudáveis (Controle, n=10, barra aberta) e o RNA total, extraído utilizando-se o reagente TRIzol. O cDNA das amostras foi produzido a partir do mRNA e utilizado para detectar a presença de mensagens para citocinas e b-actina, utilizando-se primers específicos. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de acrilamida 6% e corados com nitrato de prata (AgNO₃). As barras representam a porcentagem de amostras gengivais positivas para cada citocina analisada.

relação à expressão de CD69, a percentagem de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ foi estatisticamente maior no grupo com periodontite crônica (29,33 ± 5,90%) em comparação ao grupo com gengivite (16,11 ± 6,07%) e controle (7,30 ± 1,84%) (Figura 10H). Nas células T CD8⁺, a percentagem de co-expressão de CD69 foi estatisticamente maior no grupo com periodontite crônica (27,09 ± 8,57%) em relação ao grupo com gengivite (12,08 ± 3,58%) e controle (6,46 ± 1,94%) (Figura 10H).

11. Expressão diferencial de citocinas entre lesões periodontais de pacientes com gengivite e periodontite crônica. O papel das citocinas no controle da migração celular e na imunorregulação durante a doença periodontal não estão bem determinados. Informações em relação à relevância e cinética de expressão das citocinas no curso da doença periodontal humana são escassas (Garlet *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2004; Garlet *et al.*, 2005). Com o intuito de estabelecer o papel de citocinas nesta doença analisamos a presença de citocinas nas lesões por RT-PCR. Os dados revelaram que há maior frequência de expressão de IFN- γ nas lesões de pacientes com gengivite (75%) quando comparada com pacientes com periodontite (33%, Figura 11). Em relação à presença de TNF- α , outra citocina importante para o desenvolvimento da doença periodontal, os resultados revelaram significativa frequência de expressão para esta citocina apenas nas lesões de pacientes com gengivite (25%, Figura 11). Em relação a IL-10, os resultados revelaram alta frequência de expressão para esta citocina (100%) entre as lesões tanto de pacientes com gengivite quanto de periodontite. A análise da frequência de IL-4 revelou altos índices de expressão desta citocina, sendo que a maior frequência foi observada entre as lesões de pacientes com periodontite (100%) (Figura 11).

DISCUSSÃO

As doenças periodontais (DPs) são alterações crônicas inflamatórias dos tecidos de suporte dos órgãos dentais, cuja etiologia é dependente da presença de bactérias periodopatogênicas. Apesar da presença de microrganismos periodontopatogênicos ser fundamental para o início do desenvolvimento da maioria das doenças periodontais, a amplificação e progressão desse processo são altamente dependentes da resposta imune e inflamatória gerada pelo hospedeiro em resposta a esses microrganismos e seus produtos. Acredita-se que tal resposta seja responsável pela proteção do hospedeiro contra a infecção bacteriana. Contudo, não se conhece qual o nível de tal proteção, uma vez que diversos estudos têm demonstrado que tais doenças podem atuar como modificadoras da saúde sistêmica dos pacientes, predispondo à ocorrência ou ao agravamento de diversos estados patológicos (Loesche, 1993; AAP, 1996; AAP, 1998; Page, 1998; Fowler *et al.*, 2001; Kinane e Lappin, 2001). Pacientes com esta doença apresentam diferentes graus de comprometimento da resposta imune celular, desde imunossupressão até resposta imune aparentemente preservada.

As primeiras evidências da imunossupressão em pacientes com doenças periodontais datam de 1970 (Ivanyi e Lehner, 1970). Em 1971, Ivanyi & Lehner demonstraram que PBMCs de pacientes com periodontite crônica severa apresentam depressão da resposta proliferativa de linfócitos frente ao extrato do biofilme dentobacteriano autógeno. Além disso, a imunossupressão antígeno-específica foi descrita recentemente por vários pesquisadores (Shenker *et al.*, 1982; Shenker e DiRienzo, 1984; Shenker *et al.*, 1991; Gemmell e Seymour, 1992; Kinder Haake e Lindemann, 1997; do Vale *et al.*, 2004), que demonstraram a depressão da resposta proliferativa de linfócitos estimulados por antígenos de periodontopatógenos, em pacientes com periodontite crônica. Embora vários pesquisadores tenham se dedicado a estabelecer quais os mecanismos responsáveis pela imunossupressão observada durante

o curso da infecção com periodontopatógenos este processo ainda não esta totalmente esclarecido.

Com objetivo investigar a participação de células T e de moléculas co-estimulatórias na imunomodulação da doença periodontal humana, inicialmente, observamos que nossos resultados sobre a resposta proliferativa de linfócitos de pacientes com doenças periodontais se assemelham aos resultados da literatura (Ivanyi e Lehner, 1970; Ivanyi e Lehner, 1971; Gaumer *et al.*, 1976; Lang e Smith, 1976) que demonstraram que PBMCs de indivíduos com gengivite proliferam em resposta a antígenos de periodontopatógenos, enquanto indivíduos saudáveis e com periodontite crônica apresentaram a baixa atividade blastogênica (Figura 1). O próximo passo foi investigar os mecanismos que poderiam ser responsáveis pela ausência de resposta de células T observada nos pacientes. Primeiramente, os resultados não demonstraram um desequilíbrio significativo nos níveis de secreção de IFN- γ , IL-10 e TGF- β por PBMC de pacientes que explicassem a ausência de resposta de células T (Figura 2). Conseqüentemente, outros mecanismos estariam envolvidos em modular a resposta de células T durante o curso da infecção com periodontopatógenos.

Recentemente, evidências têm emergido demonstrando que a molécula co-estimulatória CD28 é um modulador crucial da ativação de células T, uma vez que fornecem o estímulo adicional para a produção IL-2 e a expressão de seu receptor (IL-2R) (Sperling e Bluestone, 1996). Assim, investigamos se a expressão de CD28 por células T sanguíneas de pacientes estaria regulada negativamente, como ocorrer em células T de indivíduos infectados com outros patógenos como, por exemplo, *Trypanosoma cruzi* (Dutra *et al.*, 1996). Contudo, encontramos níveis normais da expressão de CD28 por células sanguíneas de pacientes, recém isoladas ou cultivadas na

presença de antígenos de Aa e Pg.

Com isso, a incapacidade de proliferar em resposta a estimulação específica poderia ser devido à expressão aumentada de CTLA-4, uma molécula que se liga também a B7, promovendo anergia e influenciando negativamente a função efetora de células T, inibindo, assim, a progressão no ciclo celular (Chambers *et al.*, 2001; Frauwirth e Thompson, 2002). De fato, detectamos um aumento na percentagem de células T CD8⁺ sanguíneas expressando CTLA-4 em pacientes com periodontite crônica, sendo este aumento mais expressivo nos pacientes com gengivite (Figura 4D). Esses resultados se assemelham a alta expressão de CTLA-4 observada em células de pacientes com malária e durante a infecção com HIV (Riley *et al.*, 2000; Schlotmann *et al.*, 2000). Nossos achados em relação à estimulação *in vitro* com antígenos de Aa e Pg revelaram que esses antígenos induzem a expressão de CTLA-4, sendo esta indução mais intensa nas células de pacientes com periodontite crônica (Figura 5B). Esses resultados se assemelham aos de Aoyagi *et al.* (2000) demonstrando que antígeno da parede extracelular de *P. gingivalis* induz a expressão de CTLA-4 em linfócitos sanguíneos de pacientes com periodontite crônica. Em pacientes com HIV a resposta linfoproliferativa foi correlacionada inversamente com a expressão de CTLA-4, sugerindo que CTLA-4 poderia estar envolvido com a eliminação ou indução de anergia de células T durante a infecção com o HIV-1 (Riley *et al.*, 2000). Altos níveis de expressão de CTLA-4 também foram correlacionados com baixa resposta proliferativa e produção de IL-2 por células T de pacientes com doença de Hodgkin's (Kosmaczewska *et al.*, 2002). Contudo, a adição de anticorpos neutralizantes para CTLA-4 em cultura de células de pacientes com DPs não restaurou a resposta proliferativa de células T (dados não apresentados), diferindo do observado durante a infecção com HIV (Riley *et al.*, 2000). Dados da literatura mostraram que a ligação de CTLA-4 leva à produção de TGF- β e esta citocina

mediaria seu efeito inibitório (Chen *et al.*, 1998). TGF- β pode inibir a proliferação de células T (Wahl *et al.*, 1988) e a ativação de macrófagos (Silva *et al.*, 1991) e esta citocina foi detectada em altos níveis no sobrenadante das culturas de células de pacientes com doenças periodontais e indivíduos controles na presença ou ausência de estímulo (Figura 2). Entretanto, dados recentes sobre a infecção com *P. brasiliensis* demonstram que o bloqueio da sinalização via CTLA-4 não modulou a produção de TGF- β (Campanelli e Silva, 2003). Esta possibilidade é compatível com resultados recentes que mostraram que CTLA-4 e TGF- β representam mecanismos distintos na regulação da resposta imune (Sullivan *et al.*, 2001). Em fato, apesar de não termos bloqueado TGF- β nas culturas, os altos índices de proliferação das células T de pacientes, após a estimulação com PHA, em presença de altos níveis de TGF- β poderiam indicar que esta citocina não estaria envolvida diretamente na baixa resposta proliferativa de células T de pacientes.

Uma explicação alternativa para a ausência de resposta proliferativa de células T de pacientes com periodontite crônica poderia estar relacionada a um aumento na expressão de PD-1, uma molécula co-estimulatória que tem sido amplamente estudada pelo seu papel na inativação de células T (Ishida *et al.*, 1992; Shinohara *et al.*, 1994; Vibhakar *et al.*, 1997; Greenwald *et al.*, 2005). A associação do PD-1 com seus ligantes PD-L1 (B7-H2) e PD-L2 (B7-DC) inibe a produção de IL-2 e a proliferação de células T (Carter *et al.*, 2002), o que compromete negativamente sua função efetora. De fato, detectamos um aumento significativo na percentagem de células T sangüíneas expressando PD-1 em pacientes com periodontite crônica (Figura 4E) e a estimulação *in vitro* dessas células com antígenos de Aa e Pg induziu significativamente a expressão de PD-1 em células T CD4⁺ de pacientes com periodontite crônica (Figura 5D). A alta expressão de PD-1 foi observada também em infecções virais, como HIV e HCV, porém o aumento de

expressão da molécula ocorreu principalmente em células T CD8⁺ T vírus-específica (Day *et al.*, 2006; Petrovas *et al.*, 2006; Trautmann *et al.*, 2006; Urbani *et al.*, 2006). De fato, a expressão de PD-1 em células T CD4⁺ ativadas é um evento natural, mas a indução em níveis tão expressivos como observado em nossos resultados não foi relatada até o momento. Esses resultados sustentam a hipótese do envolvimento da sinalização via PD-1/PD-L na baixa resposta proliferativa de células T de pacientes com periodontite crônica.

Entretanto, a adição de anticorpos neutralizantes para PD-1 em cultura de células de pacientes com doenças periodontais não restaurou a resposta proliferativa de células T (Figura 7), diferindo dos resultados observados durante a infecção com HIV (Day *et al.*, 2006; Petrovas *et al.*, 2006; Trautmann *et al.*, 2006). Mas, um aspecto importante foi a observação de que o bloqueio da sinalização via PD-1 levou ao aumento na produção de IFN- γ por PBMC de pacientes com periodontite crônica, com gengivite e indivíduos controle (Figura 8A). Este é um resultado muito interessante por que indica que algumas células T não produzem IFN- γ após a estimulação com os antígenos de Aa e Pg devido à expressão de PD-1 em sua superfície. Estas observações estão de acordo com os achados observados nas infecções com HIV, onde o bloqueio da via PD-1/PD-L restaura a produção de IFN- γ por células T CD8⁺ vírus-específica (Day *et al.*, 2006; Petrovas *et al.*, 2006; Trautmann *et al.*, 2006). Os resultados demonstram que a sinalização via PD-1 está envolvida na modulação da resposta imune durante a infecção por periodontopatógenos em humanos.

O bloqueio da sinalização via PD-1 levou a significativa diminuição na produção de IL-10 por PBMC de pacientes com DPs (Figura 8B), indicando que a sinalização via PD-1/PD-L estaria contribuindo para a produção de IL-10 por células de pacientes. IL-10 é

uma citocina imunoreguladora que atua modulando negativamente a ativação de macrófagos (van Den Broek *et al.*, 2000). Dados da literatura demonstraram que a produção de IL-10 leva à atenuação da severidade da DP experimental, através do controle da expressão de citocinas inflamatórias, quimiocinas, e mediadores envolvidos na destruição dos tecidos periodontais (Owens *et al.*, 1996; Sasaki *et al.*, 2000; Cuzzocrea *et al.*, 2001; Al-Rasheed *et al.*, 2004; Saidenberg-Kermanac'h *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2004) e que tal citocina não parece interferir no controle da infecção periodontal.

Em 2000, Kaway *et al.* sugeriu que a ausência de resposta de células T durante a infecção com periodontopatógenos poderia ser devido a outro mecanismo que influenciasse na ativação de células T. Contudo, trabalho publicado anteriormente demonstrou que em humanos este quadro de imunossupressão estaria associado à redução no número de células de Langerhans (CLs) em lesões inflamatórias crônicas, o que comprometeria a apresentação antigênica gerando, desta forma, imunidade celular suprimida (Gimenez *et al.*, 1987). Contrariamente, dados da literatura revelaram alta positividade para células dendríticas e células apresentadoras de antígenos acessórias nos tecidos periodontais saudáveis e doentes (Seguier *et al.*, 2000; Seguier *et al.*, 2003; Cutler e Jotwani, 2004), indicando assim que as infecções periodontais não estariam relacionadas à disfunção ou eliminação de células apresentadoras ou alteração no processo de apresentação antigênica. Ainda neste contexto, detectamos uma alta percentagem de células dendríticas e macrófagos no sítio da infecção, bem como a produção de TNF- α , o que demonstraria que as células dendríticas e os macrófagos estariam eficientemente produzindo fatores quimiotáticos e contribuindo assim para o desenvolvimento da resposta imune.

Tais resultados fornecem evidências interessantes a respeito do possível envolvimento de moléculas co-estimulatórias no controle da infecção periodontal. Contudo, os resultados até aqui apresentados não nos permitem estabelecer o nível de proteção conferido por tal resposta, assim como analisar o real papel de tais fatores no controle da doença *in situ*. Nesse sentido, buscando esclarecer o papel das moléculas co-estimulatórias na imunomodulação das DPs *in situ*, realizamos a análise dessas moléculas em células T recém isoladas do sitio de infecção de pacientes com diferentes apresentações das DPs.

Como previamente demonstrado (Seymour e Greenspan, 1979; Seymour *et al.*, 1983; Gemmell e Seymour, 1995; Mathur e Michalowicz, 1997; Garlet *et al.*, 2007), a infecção com periodontopatógenos leva ao desenvolvimento de um infiltrado inflamatório nos tecidos periodontais (Figura 9) e diversos tipos celulares como neutrófilos, macrófagos, linfócitos T CD4, T CD8 e B podem ser encontrados em números elevados nos tecidos de pacientes com DPs. De forma interessante, os nossos resultados demonstraram um aumento gradativo no número de células inflamatórias isoladas dos tecidos periodontais de indivíduos controle, pacientes com gengivite e pacientes com periodontite. Ao analisarmos o fenótipo de tais células através de citometria de fluxo, verificamos que neutrófilos, macrófagos, linfócitos T CD4, linfócitos T CD8 e linfócitos B se encontravam em maior número nos pacientes com periodontite crônica (Figura 9).

De acordo com os resultados, ficou evidente que apesar de um aumento na quantidade das células inflamatórias isoladas das lesões, a proporção das células se manteve similar entre os três grupos analisados. O maior número de células inflamatórias observado no tecido periodontal de pacientes com periodontite pode ser explicado pela

persistência do agente agressor e a constante liberação de antígenos que induziriam a migração constante de células inflamatórias para o foco da infecção (Gemmell *et al.*, 2001a; Gemmell e Seymour, 2004; Silva *et al.*, 2007)

Nossos resultados também demonstraram que a expressão de PD-1 e CTLA-4 estava significativamente aumentada nas células isoladas do tecido periodontal de pacientes com periodontite crônica (Figura 10). Este perfil de indução de CTLA-4 e PD-1 foi similar ao observado no sangue periférico dos pacientes. Como demonstrado nos ensaios *in vitro*, a alta expressão dessas moléculas inibitórias, particularmente PD-1, correlacionar-se-iam com a inibição de ativação de células T e produção de citocinas como, por exemplo, IFN- γ . De fato, nossos resultados revelaram que há uma baixa positividade para IFN- γ nas lesões de pacientes com periodontite crônica, lesões estas que apresentaram os maiores índices de expressão de PD-1 (Figura 11). Estes resultados estão de acordo com dados da literatura que sugerem que a baixa expressão de IFN- γ está associada a quadros de periodontite crônica em humanos. Contudo, estudo em animais deficientes de IFN- γ , após infecção com *P. gingivalis*, relataram que estes desenvolvem uma fraca resposta inflamatória, o que difere dos nossos achados, uma vez que, mesmo na presença de baixos níveis da citocinas, detectamos um intenso infiltrado inflamatório nos tecidos periodontais de pacientes com periodontite crônica. Tal divergência pode ser explicada pelo fato de que no modelo experimental não há a produção de IFN- γ , o que influenciaria diretamente na produção de quimiocinas, e em nosso estudo, apesar de baixo, os níveis da citocina produzidos não prejudicariam de forma significativa a produção de quimiocinas e migração celular (Baker *et al.*, 1999b). Adicionalmente, a baixa produção de IFN- γ detectada *in situ* poderia contribuir para acentuar a severidade da doença, uma vez que esta citocina estimula fibroblastos gengivais a produzirem NO (Kendall *et al.*, 2000; Daghigh *et al.*, 2002), potencialmente

envolvido no controle de microrganismos no microambiente periodontal (Kendall *et al.*, 2001; Rausch-Fan e Matejka, 2001). Além disso, a ausência de IFN- γ leva ao menor nível de inflamação e destruição tecidual na artrite reumatóide (Kageyama *et al.*, 1998; Butler *et al.*, 1999; Vervoordeldonk e Tak, 2002; Mauri *et al.*, 2003). Entretanto, um estudo recente demonstra que IFN- γ não apresenta papel crítico na inflamação e na reabsorção óssea periapical (Sasaki *et al.*, 2004).

Após identificar a presença e caracterizar as subpopulações de linfócitos, nosso próximo questionamento foi se haveria associação entre estes linfócitos com outros parâmetros da resposta imune induzida por antígenos, tais como a geração e diferenciação em células efectoras e de memória. A resposta imune antígeno-específica é caracterizada por reconhecimento do antígeno, ativação, proliferação e diferenciação em células efectoras/memória que serão responsáveis pelos mecanismos imunes efetores (Janeway, 2001). A diferenciação em células de memória é outro processo bastante complexo, também caracterizado pela expressão diferencial de moléculas de superfície celular. Assim, estudos fenotípicos utilizam a combinação de diferentes marcadores para caracterizar as células de memória, tais como a alta expressão da isoforma de alto peso molecular CD45RO, combinada com a baixa expressão da molécula CD62L e dos marcadores de ativação CD25 e CD69 (Dutton *et al.*, 1998).

Neste contexto, nossos resultados demonstraram que a frequência de células CD69⁺ e CD45RO foi maior na subpopulação de linfócito T CD4 e T CD8 isolada das lesões de pacientes com periodontite crônica. A frequência de células CD62L⁺ também foi maior nas duas subpopulações de linfócitos isoladas das lesões de pacientes com periodontite crônica. Contudo, as percentagens de células positivas para este marcador foram menores do que a observada para os outros marcadores. Considerando que após

reconhecimento do antígeno a expressão das moléculas CD62L diminui e ocorre aquisição seqüencial dos marcadores de ativação, esses resultados são consistentes com o perfil de células recentemente ativadas. Nossos resultados também sugerem que os linfócitos TCD4 e TCD8 identificados no grupo de pacientes com periodontite apresentam fenótipo de memória, pois, a análise da expressão da molécula CD45RO e CD69 demonstraram maior freqüência de células expressando este marcador. Estes resultados diferem do obtido com a análise do sangue periférico, onde detectamos percentagens similares de células de memória entre os três grupos analisados. Recentemente, Lee *et al.* (2004) (Lee *et al.*, 2004) utilizaram extratos da bactéria oral *Treponema denticola* para estudar a resposta imune e demonstraram que estes extratos interferiram com a linfoproliferação, por impedir que as células entrassem na fase S do ciclo celular. Contudo, estes extratos bacterianos não inibiram a expressão dos marcadores de ativação celular CD25 e CD69. Em contrapartida, percentagens significantes de células T CD45RO⁺ também foram detectadas nas lesões de pacientes com gengivite e controle. Tal fato pode ser explicado pela migração natural de células T de memória para tecidos periféricos, devido à produção de quimiocinas constitutivas, como por exemplo, TARC e MDC. De fato, dados recentes da literatura relatam à produção destas quimiocinas em tecido periodontal humano (Garlet *et al.*, 2003).

CONCLUSÕES

- A estimulação com antígenos de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* induz um aumento na expressão de moléculas co-estimulatórias CTLA-4 e PD-1 em células T sanguíneas de pacientes com DPs.

- O bloqueio da interação PD-1/PD-L modula a produção de IL-10 e IFN- γ por células de pacientes com DPs frente a estímulos de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*.

- A expressão de PD-1 e CTLA-4 em linfócitos isolados de lesões com periodontite crônica é elevada e correlaciona-se com a baixa frequência de IFN- γ

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Genco RJ. Host responses in periodontal diseases: current concepts. *Journal of periodontology*. 1992 Apr;63(4 Suppl):338-55.
- Lamster IB. The host response in gingival crevicular fluid: potential applications in periodontitis clinical trials. *Journal of periodontology*. 1992 Dec;63(12 Suppl):1117-23.
- AAP. Consensus report. Periodontal diseases: epidemiology and diagnosis. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*. 1996 Nov;1(1):216-22.
- AAP. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Journal of the American Dental Association (1939)*. 1998 Sep;129 Suppl:58S-62S.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*. 1999 Dec;4(1):1-6.
- Meyer DH, Fives-Taylor PM. Oral pathogens: from dental plaque to cardiac disease. *Current opinion in microbiology*. 1998 Feb;1(1):88-95.
- Beck JD, Pankow J, Tyroler HA, Offenbacher S. Dental infections and atherosclerosis. *American heart journal*. 1999 Nov;138(5 Pt 2):S528-33.
- Hujoel PP, Drangsholt M, Spiekerman C, DeRouen TA. Periodontal disease and coronary heart disease risk. *Jama*. 2000 Sep 20;284(11):1406-10.
- Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clinical microbiology reviews*. 2000 Oct;13(4):547-58.
- 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. *Journal of periodontology*. 2000 Oct;71(10):1528-34.
- Soikkonen K, Wolf J, Salo T, Tilvis R. Radiographic periodontal attachment loss as an indicator of death risk in the elderly. *Journal of clinical periodontology*. 2000 Feb;27(2):87-92.
- Fowler EB, Breault LG, Cuenin MF. Periodontal disease and its association with systemic disease. *Military medicine*. 2001 Jan;166(1):85-9.
- Shimazaki Y, Soh I, Saito T, Yamashita Y, Koga T, Miyazaki H, et al. Influence of dentition status on physical disability, mental impairment, and mortality in institutionalized elderly people. *Journal of dental research*. 2001 Jan;80(1):340-5.
- Terpenning MS, Taylor GW, Lopatin DE, Kerr CK, Dominguez BL, Loesche WJ. Aspiration pneumonia: dental and oral risk factors in an older veteran population. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2001 May;49(5):557-63.
- Kinane DF, Lappin DF. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta odontologica Scandinavica*. 2001 Jun;59(3):154-60.
- Teng YT. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(4):237-52.

Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2004;35:21-41.

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

Page RC. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*. 1998 Jul;3(1):108-20.

Ebersole JL, Cappelli D, Holt SC. Periodontal diseases: to protect or not to protect is the question? *Acta odontologica Scandinavica*. 2001 Jun;59(3):161-6.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology* 2000. 2002;28:12-55.

Sbordone L, Bortolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clinical oral investigations*. 2003 Dec;7(4):181-8.

Lehner T, Wilton JM, Ivanyi L, Manson JD. Immunological aspects of juvenile periodontitis (periodontosis). *Journal of periodontal research*. 1974;9(5):261-72.

Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1976 Mar;34(3):235-49.

Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontology* 2000. 2002;29:177-206.

Saxe SR, Greene JC, Bohannon HM, Vermillion JR. Oral debris, calculus, and periodontal disease in the beagle dog. *Periodontics*. 1967 Sep-Oct;5(5):217-25.

Page RC, Schroeder HE. Spontaneous chronic periodontitis in adult dogs. A clinical and histopathological survey. *Journal of periodontology*. 1981 Feb;52(2):60-73.

Lindhe J, Socransky S, Nyman S, Westfelt E, Haffajee A. Effect of age on healing following periodontal therapy. *Journal of clinical periodontology*. 1985 Oct;12(9):774-87.

Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*. 1997 Jan;24(1):72-7.

Clark WB, Loe H. Mechanisms of initiation and progression of periodontal disease. *Periodontology* 2000. 1993 Jun;2:72-82.

Albandar JM, Brown LJ, Loe H. Clinical features of early-onset periodontitis. *Journal of the American Dental Association* (1939). 1997 Oct;128(10):1393-9.

Albandar JM, Kingman A, Brown LJ, Loe H. Gingival inflammation and subgingival calculus as determinants of disease progression in early-onset periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 1998 Mar;25(3):231-7.

Oliver RC, Brown LJ, Loe H. Periodontal diseases in the United States population. *Journal of periodontology*. 1998 Feb;69(2):269-78.

Wiebe SH, Hafezi M, Sandhu HS, Sims SM, Dixon SJ. Osteoclast activation in inflammatory periodontal diseases. *Oral diseases*. 1996 Jun;2(2):167-80.

Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology 2000*. 1997 Jun;14:112-43.

Gemmell E, Carter CL, Seymour GJ. Chemokines in human periodontal disease tissues. *Clinical and experimental immunology*. 2001a Jul;125(1):134-41.

Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta odontologica Scandinavica*. 2001 Jun;59(3):167-73.

Garlet GP, Martins W, Jr., Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*. 2004 Aug;31(8):671-9.

Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral microbiology and immunology*. 2006 Feb;21(1):12-20.

Ooshima T, Nishiyama N, Hou B, Tamura K, Amano A, Kusumoto A, et al. Occurrence of periodontal bacteria in healthy children: a 2-year longitudinal study. *Community dentistry and oral epidemiology*. 2003 Dec;31(6):417-25.

Tietze K, Dalpke A, Morath S, Mutters R, Heeg K, Nonnenmacher C. Differences in innate immune responses upon stimulation with gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal of periodontal research*. 2006 Oct;41(5):447-54.

Sakai VT, Campos MR, Machado MA, Lauris JR, Greene AS, Santos CF. Prevalence of four putative periodontopathic bacteria in saliva of a group of Brazilian children with mixed dentition: 1-year longitudinal study. *International journal of paediatric dentistry / the British Paedodontic Society [and] the International Association of Dentistry for Children*. 2007 May;17(3):192-9.

Schenkein HA. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2006;40:77-93.

Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *Journal of clinical periodontology*. 2005;32 Suppl 6:57-71.

Marshall RI. Gingival defensins: linking the innate and adaptive immune responses to dental plaque. *Periodontology* 2000. 2004;35:14-20.

Dale BA, Fredericks LP. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Current issues in molecular biology*. 2005 Jul;7(2):119-33.

Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, et al. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987 Dec;84(24):9233-7.

Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *Journal of dental research*. 2007 Apr;86(4):306-19.

Attstrom R. The roles of gingival epithelium and phagocytosing leukocytes in gingival defence. *Journal of clinical periodontology*. 1975 Feb;2(1):25-32.

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

Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral diseases*. 2000 May;6(3):138-51.

Tonetti MS, Imboden MA, Gerber L, Lang NP, Laissue J, Mueller C. Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. *Infection and immunity*. 1994 Sep;62(9):4005-14.

Yu X, Graves DT. Fibroblasts, mononuclear phagocytes, and endothelial cells express monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflamed human gingiva. *Journal of periodontology*. 1995 Jan;66(1):80-8.

Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2000 Aug;2(10):1181-92.

Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *Journal of periodontology*. 2003 Mar;74(3):391-401.

Chapple CC, Srivastava M, Hunter N. Failure of macrophage activation in destructive periodontal disease. *The Journal of pathology*. 1998 Nov;186(3):281-6.

Lappin DF, Koulouri O, Radvar M, Hodge P, Kinane DF. Relative proportions of mononuclear cell types in periodontal lesions analyzed by immunohistochemistry. *Journal of clinical periodontology*. 1999 Mar;26(3):183-9.

Kabashima H, Yoneda M, Nagata K, Hirofuji T, Ishihara Y, Yamashita M, et al. The presence of chemokine receptor (CCR5, CXCR3, CCR3)-positive cells and chemokine (MCP1, MIP-1alpha, MIP-1beta, IP-10)-positive cells in human periapical granulomas. *Cytokine*. 2001 Oct 21;16(2):62-6.

Park SH, Hsiao GY, Huang GT. Role of substance P and calcitonin gene-related peptide in the regulation of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 expression in human dental pulp. *International endodontic journal*. 2004 Mar;37(3):185-92.

Wright KM, Friedland JS. Regulation of chemokine gene expression and secretion in *Staphylococcus aureus*-infected osteoblasts. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2004 Jul;6(9):844-52.

Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunology today*. 1998 Dec;19(12):568-74.

Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature*. 2000 Mar 23;404(6776):407-11.

Gemmell E, Bird PS, Carter CL, Drysdale KE, Seymour GJ. Effect of *Fusobacterium nucleatum* on the T and B cell responses to *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Clinical and experimental immunology*. 2002 May;128(2):238-44.

Baker PJ, Garneau J, Howe L, Roopenian DC. T-cell contributions to alveolar bone loss in response to oral infection with *Porphyromonas gingivalis*. *Acta odontologica Scandinavica*. 2001 Aug;59(4):222-5.

Berglundh T, Liljenberg B, Lindhe J. Some cytokine profiles of T-helper cells in lesions of advanced periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2002 Aug;29(8):705-9.

Yamazaki K, Yoshie H, Seymour GJ. T cell regulation of the immune response to infection in periodontal diseases. *Histology and histopathology*. 2003 Jul;18(3):889-96.

Bastos KR, Marinho CR, Barboza R, Russo M, Alvarez JM, D'Imperio Lima MR. What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells? *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2004 May;6(6):630-6.

Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine & growth factor reviews*. 2001 Mar;12(1):53-72.

Brombacher F, Kastelein RA, Alber G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends in immunology*. 2003 Apr;24(4):207-12.

Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annual review of immunology*. 2003;21:713-58.

Bogdan C. The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Current opinion in immunology*. 2000 Aug;12(4):419-24.

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

van der Veen RC. Nitric oxide and T helper cell immunity. *International immunopharmacology*. 2001 Aug;1(8):1491-500.

- Cooper AM, Kipnis A, Turner J, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present. *J Immunol*. 2002 Feb 1;168(3):1322-7.
- Chakravorty D, Hensel M. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2003 Jun;5(7):621-7.
- Roberts FA, McCaffery KA, Michalek SM. Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodontitis. *Journal of dental research*. 1997 Dec;76(12):1833-9.
- Tokoro Y, Matsuki Y, Yamamoto T, Suzuki T, Hara K. Relevance of local Th2-type cytokine mRNA expression in immunocompetent infiltrates in inflamed gingival tissue to periodontal diseases. *Clinical and experimental immunology*. 1997 Jan;107(1):166-74.
- Lappin DF, MacLeod CP, Kerr A, Mitchell T, Kinane DF. Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. *Clinical and experimental immunology*. 2001 Feb;123(2):294-300.
- Ukai T, Mori Y, Onoyama M, Hara Y. Immunohistological study of interferon-gamma and interleukin-4-bearing cells in human periodontitis gingiva. *Archives of oral biology*. 2001 Oct;46(10):901-8.
- Salvi GE, Brown CE, Fujihashi K, Kiyono H, Smith FW, Beck JD, et al. Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. *Journal of periodontal research*. 1998 May;33(4):212-25.
- Sigusch B, Klinger G, Glockmann E, Simon HU. Early-onset and adult periodontitis associated with abnormal cytokine production by activated T lymphocytes. *Journal of periodontology*. 1998 Oct;69(10):1098-104.
- Kawai T, Eisen-Lev R, Seki M, Eastcott JW, Wilson ME, Taubman MA. Requirement of B7 costimulation for Th1-mediated inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. *J Immunol*. 2000 Feb 15;164(4):2102-9.
- Takeichi O, Haber J, Kawai T, Smith DJ, Moro I, Taubman MA. Cytokine profiles of T-lymphocytes from gingival tissues with pathological pocketing. *Journal of dental research*. 2000 Aug;79(8):1548-55.
- Sun M, Opavsky MA, Stewart DJ, Rabinovitch M, Dawood F, Wen WH, et al. Temporal response and localization of integrins beta1 and beta3 in the heart after myocardial infarction: regulation by cytokines. *Circulation*. 2003 Feb 25;107(7):1046-52.
- Garlet GP, Martins W, Jr., Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *Journal of periodontal research*. 2003 Apr;38(2):210-7.
- Tamai R, Sakuta T, Matsushita K, Torii M, Takeuchi O, Akira S, et al. Human gingival CD14(+) fibroblasts primed with gamma interferon increase production of interleukin-8

in response to lipopolysaccharide through up-regulation of membrane CD14 and MyD88 mRNA expression. *Infection and immunity*. 2002 Mar;70(3):1272-8.

Mochizuki S, Kobayashi M, Suzuki T, Oikawa A, Koseki T, Nishihara T, et al. Gamma-interferon enhances expression of CD14/MyD88 and subsequent responsiveness to lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human gingival fibroblasts. *Journal of periodontal research*. 2004 Oct;39(5):333-43.

Martelli-Junior H, Cotrim P, Graner E, Sauk JJ, Coletta RD. Effect of transforming growth factor-beta1, interleukin-6, and interferon-gamma on the expression of type I collagen, heat shock protein 47, matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-2 by fibroblasts from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis. *Journal of periodontology*. 2003 Mar;74(3):296-306.

Baker PJ, Carter S, Dixon M, Evans RT, Roopenian DC. Serum antibody response to oral infection precedes but does not prevent *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in mice. *Oral microbiology and immunology*. 1999a Jun;14(3):194-6.

Yamazaki K, Nakajima T, Hara K. Immunohistological analysis of T cell functional subsets in chronic inflammatory periodontal disease. *Clinical and experimental immunology*. 1995 Mar;99(3):384-91.

Gemmell E, Seymour GJ. Cytokine profiles of cells extracted from humans with periodontal diseases. *Journal of dental research*. 1998 Jan;77(1):16-26.

Bartova J, Kratka-Opatrna Z, Prochazkova J, Krejsa O, Duskova J, Mrklas L, et al. Th1 and Th2 cytokine profile in patients with early onset periodontitis and their healthy siblings. *Mediators of inflammation*. 2000;9(2):115-20.

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. *Journal of periodontal research*. 2000 Dec;35(6):319-28.

Petit MD, Hovenkamp E, Hamann D, Roos MT, van der Velden U, Miedema F, et al. Phenotypical and functional analysis of T cells in periodontitis. *Journal of periodontal research*. 2001 Aug;36(4):214-20.

Moriyama H, Ukai T, Hara Y. Interferon-gamma production changes in parallel with bacterial lipopolysaccharide induced bone resorption in mice: an immunohistometrical study. *Calcified tissue international*. 2002 Jul;71(1):53-8.

Takayanagi H, Kim S, Taniguchi T. Signaling crosstalk between RANKL and interferons in osteoclast differentiation. *Arthritis research*. 2002;4 Suppl 3:S227-32.

Udagawa N. The mechanism of osteoclast differentiation from macrophages: possible roles of T lymphocytes in osteoclastogenesis. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2003;21(6):337-43.

Kendall HK, Haase HR, Li H, Xiao Y, Bartold PM. Nitric oxide synthase type-II is synthesized by human gingival tissue and cultured human gingival fibroblasts. *Journal of periodontal research*. 2000 Aug;35(4):194-200.

- Daghigh F, Borghaei RC, Thornton RD, Bee JH. Human gingival fibroblasts produce nitric oxide in response to proinflammatory cytokines. *Journal of periodontology*. 2002 Apr;73(4):392-400.
- Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral diseases*. 2001 Jan;7(1):2-10.
- Rausch-Fan X, Matejka M. From plaque formation to periodontal disease, is there a role for nitric oxide? *European journal of clinical investigation*. 2001 Oct;31(10):833-5.
- Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annual review of immunology*. 1999;17:701-38.
- Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nature reviews*. 2002 Dec;2(12):933-44.
- Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, et al. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *Journal of clinical immunology*. 2003 May;23(3):147-61.
- Jarnicki AG, Fallon PG. T helper type-2 cytokine responses: potential therapeutic targets. *Current opinion in pharmacology*. 2003 Aug;3(4):449-55.
- Zhou M, Ouyang W. The function role of GATA-3 in Th1 and Th2 differentiation. *Immunologic research*. 2003;28(1):25-37.
- Stetson DB, Voehringer D, Grogan JL, Xu M, Reinhardt RL, Scheu S, et al. Th2 cells: orchestrating barrier immunity. *Advances in immunology*. 2004;83:163-89.
- Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nature reviews*. 2004 Aug;4(8):583-94.
- Hamilton RF, Jr., Holian A, Morandi MT. A comparison of asbestos and urban particulate matter in the in vitro modification of human alveolar macrophage antigen-presenting cell function. *Experimental lung research*. 2004 Mar;30(2):147-62.
- Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annual review of immunology*. 2004;22:891-928.
- Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annual review of immunology*. 2004;22:929-79.
- Hamilton TA, Ohmori Y, Tebo JM, Kishore R. Regulation of macrophage gene expression by pro- and anti-inflammatory cytokines. *Pathobiology*. 1999;67(5-6):241-4.
- Hamilton TA, Ohmori Y, Tebo J. Regulation of chemokine expression by antiinflammatory cytokines. *Immunologic research*. 2002;25(3):229-45.
- Yamashita U, Kuroda E. Regulation of macrophage-derived chemokine (MDC, CCL22) production. *Critical reviews in immunology*. 2002;22(2):105-14.

- Brubaker JO, Montaner LJ. Role of interleukin-13 in innate and adaptive immunity. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*. 2001 Jun;47(4):637-51.
- Hsu DH, Moore KW, Spits H. Differential effects of IL-4 and IL-10 on IL-2-induced IFN-gamma synthesis and lymphokine-activated killer activity. *International immunology*. 1992 May;4(5):563-9.
- Rousset F, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu DH, et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992 Mar 1;89(5):1890-3.
- Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annual review of immunology*. 1993;11:165-90.
- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature*. 2002 Dec 5;420(6915):502-7.
- Mittrucker HW, Kaufmann SH. Mini-review: regulatory T cells and infection: suppression revisited. *European journal of immunology*. 2004 Feb;34(2):306-12.
- Sakaguchi E, Sakaida I, Okita K. [Th1/Th2 balance in HCV-related liver cirrhosis and the effect of TGF-beta on Th1 response: possible implications for the development of hepatoma]. *Nippon rinsho*. 2004 Jul;62 Suppl 7(Pt 1):175-8.
- Fujihashi K, Yamamoto M, Hiroi T, Bamberg TV, McGhee JR, Kiyono H. Selected Th1 and Th2 cytokine mRNA expression by CD4(+) T cells isolated from inflamed human gingival tissues. *Clinical and experimental immunology*. 1996 Mar;103(3):422-8.
- Yamamoto M, Fujihashi K, Hiroi T, McGhee JR, Van Dyke TE, Kiyono H. Molecular and cellular mechanisms for periodontal diseases: role of Th1 and Th2 type cytokines in induction of mucosal inflammation. *Journal of periodontal research*. 1997 Jan;32(1 Pt 2):115-9.
- Yamazaki K, Nakajima T, Kubota Y, Gemmell E, Seymour GJ, Hara K. Cytokine messenger RNA expression in chronic inflammatory periodontal disease. *Oral microbiology and immunology*. 1997 Oct;12(5):281-7.
- Aramaki M, Nagasawa T, Koseki T, Ishikawa I. Presence of activated B-1 cells in chronic inflamed gingival tissue. *Journal of clinical immunology*. 1998 Nov;18(6):421-9.
- Sasaki H, Hou L, Belani A, Wang CY, Uchiyama T, Muller R, et al. IL-10, but not IL-4, suppresses infection-stimulated bone resorption in vivo. *J Immunol*. 2000 Oct 1;165(7):3626-30.
- Al-Rasheed A, Scheerens H, Rennick DM, Fletcher HM, Tatakis DN. Accelerated alveolar bone loss in mice lacking interleukin-10. *Journal of dental research*. 2003 Aug;82(8):632-5.

Sasaki H, Okamatsu Y, Kawai T, Kent R, Taubman M, Stashenko P. The interleukin-10 knockout mouse is highly susceptible to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss. *Journal of periodontal research*. 2004 Dec;39(6):432-41.

Eastcott JW, Yamashita K, Taubman MA, Harada Y, Smith DJ. Adoptive transfer of cloned T helper cells ameliorates periodontal disease in nude rats. *Oral microbiology and immunology*. 1994 Oct;9(5):284-9.

Cutler CW, Stanford TW, Abraham C, Cederberg RA, Boardman TJ, Ross C. Clinical benefits of oral irrigation for periodontitis are related to reduction of pro-inflammatory cytokine levels and plaque. *Journal of clinical periodontology*. 2000 Feb;27(2):134-43.

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

Goutoudi P, Diza E, Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1beta and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *Journal of dentistry*. 2004 Sep;32(7):511-20.

Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *Journal of periodontology*. 2000 Oct;71(10):1535-45.

Ivanyi L, Lehner T. Stimulation of lymphocyte transformation by bacterial antigens in patients with periodontal disease. *Archives of oral biology*. 1970 Nov;15(11):1089-96.

Ivanyi L, Lehner T. Lymphocyte transformation by sonicates of dental plaque in human periodontal disease. *Archives of oral biology*. 1971 Sep;16(9):1117-21.

Shenker BJ, McArthur WP, Tsai CC. Immune suppression induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. I. Effects on human peripheral blood lymphocyte responses to mitogens and antigens. *J Immunol*. 1982 Jan;128(1):148-54.

Shenker BJ, DiRienzo JM. Suppression of human peripheral blood lymphocytes by *Fusobacterium nucleatum*. *J Immunol*. 1984 May;132(5):2357-62.

Shenker BJ, Vitale L, Slots J. Immunosuppressive effects of *Prevotella intermedia* on in vitro human lymphocyte activation. *Infection and immunity*. 1991 Dec;59(12):4583-9.

Gemmell E, Seymour GJ. Different responses in B cells induced by *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *Archives of oral biology*. 1992;37(7):565-73.

Kinder Haake S, Lindemann RA. *Fusobacterium nucleatum* T18 aggregates human mononuclear cells and inhibits their PHA-stimulated proliferation. *Journal of periodontology*. 1997 Jan;68(1):39-44.

do Vale CH, de Oliveira Fraga LA, Costa AS, Tavares CA, Martins-Filho OA, de Macedo Farias L, et al. Antiproliferative activity of *Actinobacillus* (*Haemophilus*)

actinomycetemcomitans and Fusobacterium nucleatum in peripheral blood mononuclear cells. *Research in microbiology*. 2004 Nov;155(9):731-40.

Takahashi K, Akutsu I, Arai H, Sato N, Nagai A, Kurihara H, et al. Assessment of in vitro interleukin-2-producing capacity of peripheral blood lymphocytes from patients with periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 1997 Jan;24(1):44-50.

Gamonal J, Bascones A, Acevedo A, Blanco E, Silva A. Apoptosis in chronic adult periodontitis analyzed by in situ DNA breaks, electron microscopy, and immunohistochemistry. *Journal of periodontology*. 2001 Apr;72(4):517-25.

Hasebe A, Yoshimura A, Into T, Kataoka H, Tanaka S, Arakawa S, et al. Biological activities of Bacteroides forsythus lipoproteins and their possible pathological roles in periodontal disease. *Infection and immunity*. 2004 Mar;72(3):1318-25.

Gomes NA, Barreto-de-Souza V, Wilson ME, DosReis GA. Unresponsive CD4+ T lymphocytes from Leishmania chagasi-infected mice increase cytokine production and mediate parasite killing after blockade of B7-1/CTLA-4 molecular pathway. *The Journal of infectious diseases*. 1998 Dec;178(6):1847-51.

Gooding TM, Kemp AS, Robins-Browne RM, Smith M, Johnson PD. Acquired T-helper 1 lymphocyte anergy following infection with Mycobacterium ulcerans. *Clin Infect Dis*. 2003 Apr 15;36(8):1076-7.

Borkow G, Bentwich Z. Chronic immune activation associated with chronic helminthic and human immunodeficiency virus infections: role of hyporesponsiveness and anergy. *Clinical microbiology reviews*. 2004 Oct;17(4):1012-30, table of contents.

Smith P, Walsh CM, Mangan NE, Fallon RE, Sayers JR, McKenzie AN, et al. Schistosoma mansoni worms induce anergy of T cells via selective up-regulation of programmed death ligand 1 on macrophages. *J Immunol*. 2004 Jul 15;173(2):1240-8.

Gause WC, Halvorson MJ, Lu P, Greenwald R, Linsley P, Urban JF, et al. The function of costimulatory molecules and the development of IL-4-producing T cells. *Immunology today*. 1997 Mar;18(3):115-20.

Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annual review of immunology*. 2002;20:29-53.

Cutler CW, Jotwani R. Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontology 2000*. 2004;35:135-57.

Turka LA, Ledbetter JA, Lee K, June CH, Thompson CB. CD28 is an inducible T cell surface antigen that transduces a proliferative signal in CD3+ mature thymocytes. *J Immunol*. 1990 Mar 1;144(5):1646-53.

Dubey C, Croft M, Swain SL. Naive and effector CD4 T cells differ in their requirements for T cell receptor versus costimulatory signals. *J Immunol*. 1996 Oct 15;157(8):3280-9.

Martins GA, Campanelli AP, Silva RB, Tadokoro CE, Russo M, Cunha FQ, et al. CD28 is required for T cell activation and IFN-gamma production by CD4+ and CD8+ T cells in response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2004 Nov;6(13):1133-44.

Sperling AI, Bluestone JA. The complexities of T-cell co-stimulation: CD28 and beyond. *Immunological reviews*. 1996 Oct;153:155-82.

Noel PJ, Boise LH, Green JM, Thompson CB. CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation. *J Immunol*. 1996 Jul 15;157(2):636-42.

King CL, Xianli J, June CH, Abe R, Lee KP. CD28-deficient mice generate an impaired Th2 response to *Schistosoma mansoni* infection. *European journal of immunology*. 1996 Oct;26(10):2448-55.

Gemmell E, McHugh GB, Grieco DA, Seymour GJ. Costimulatory molecules in human periodontal disease tissues. *Journal of periodontal research*. 2001b Apr;36(2):92-100.

Chambers CA, Krummel MF, Boitel B, Hurwitz A, Sullivan TJ, Fournier S, et al. The role of CTLA-4 in the regulation and initiation of T-cell responses. *Immunological reviews*. 1996 Oct;153:27-46.

Linsley PS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Anasetti C, et al. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1992 Dec 1;176(6):1595-604.

Waterhouse P, Marengere LE, Mittrucker HW, Mak TW. CTLA-4, a negative regulator of T-lymphocyte activation. *Immunological reviews*. 1996 Oct;153:183-207.

Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *The Journal of experimental medicine*. 1995 Aug 1;182(2):459-65.

Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*. 1994 Aug;1(5):405-13.

Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in *Ctla-4*. *Science (New York, NY)*. 1995 Nov 10;270(5238):985-8.

Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity*. 1997 Apr;6(4):411-7.

Chen W, Jin W, Wahl SM. Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4(+) T cells. *The Journal of experimental medicine*. 1998 Nov 16;188(10):1849-57.

Fallarino F, Fields PE, Gajewski TF. B7-1 engagement of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 inhibits T cell activation in the absence of CD28. *The Journal of experimental medicine*. 1998 Jul 6;188(1):205-10.

- Lin H, Rathmell JC, Gray GS, Thompson CB, Leiden JM, Alegre ML. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA4) blockade accelerates the acute rejection of cardiac allografts in CD28-deficient mice: CTLA4 can function independently of CD28. *The Journal of experimental medicine*. 1998 Jul 6;188(1):199-204.
- Saito K, Sakurai J, Ohata J, Kohsaka T, Hashimoto H, Okumura K, et al. Involvement of CD40 ligand-CD40 and CTLA4-B7 pathways in murine acute graft-versus-host disease induced by allogeneic T cells lacking CD28. *J Immunol*. 1998 May 1;160(9):4225-31.
- Luhder F, Hoglund P, Allison JP, Benoist C, Mathis D. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes. *The Journal of experimental medicine*. 1998 Feb 2;187(3):427-32.
- McCoy K, Camberis M, Gros GL. Protective immunity to nematode infection is induced by CTLA-4 blockade. *The Journal of experimental medicine*. 1997 Jul 21;186(2):183-7.
- Murphy ML, Cotterell SE, Gorak PM, Engwerda CR, Kaye PM. Blockade of CTLA-4 enhances host resistance to the intracellular pathogen, *Leishmania donovani*. *J Immunol*. 1998 Oct 15;161(8):4153-60.
- Saha B, Chattopadhyay S, Germond R, Harlan DM, Perrin PJ. CTLA4 (CD152) modulates the Th subset response and alters the course of experimental *Leishmania major* infection. *European journal of immunology*. 1998 Dec;28(12):4213-20.
- Kirman J, McCoy K, Hook S, Prout M, Delahunt B, Orme I, et al. CTLA-4 blockade enhances the immune response induced by mycobacterial infection but does not lead to increased protection. *Infection and immunity*. 1999 Aug;67(8):3786-92.
- Aoyagi T, Yamazaki K, Kabasawa-Katoh Y, Nakajima T, Yamashita N, Yoshie H, et al. Elevated CTLA-4 expression on CD4 T cells from periodontitis patients stimulated with *Porphyromonas gingivalis* outer membrane antigen. *Clinical and experimental immunology*. 2000 Feb;119(2):280-6.
- Campanelli AP, Martins GA, Souto JT, Pereira MS, Livonesi MC, Martinez R, et al. Fas-Fas ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. *The Journal of infectious diseases*. 2003 May 1;187(9):1496-505.
- Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal*. 1992 Nov;11(11):3887-95.
- Shinohara T, Taniwaki M, Ishida Y, Kawaichi M, Honjo T. Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). *Genomics*. 1994 Oct;23(3):704-6.
- Vibhakar R, Juan G, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Finger LR. Activation-induced expression of human programmed death-1 gene in T-lymphocytes. *Experimental cell research*. 1997 Apr 10;232(1):25-8.

- Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annual review of immunology*. 2005;23:515-48.
- Iwai Y, Terawaki S, Ikegawa M, Okazaki T, Honjo T. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *The Journal of experimental medicine*. 2003 Jul 7;198(1):39-50.
- Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*. 2006 Sep 21;443(7109):350-4.
- Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, Price DA, Gostick E, Adams WC, et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *The Journal of experimental medicine*. 2006 Oct 2;203(10):2281-92.
- Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature medicine*. 2006 Oct;12(10):1198-202.
- Urbani S, Amadei B, Tola D, Massari M, Schivazappa S, Missale G, et al. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *Journal of virology*. 2006 Nov;80(22):11398-403.
- Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature immunology*. 2007 Mar;8(3):239-45.
- Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International immunology*. 1996 May;8(5):765-72.
- Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine*. 2000 Oct 2;192(7):1027-34.
- Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI, et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2001 Apr 2;193(7):839-46.
- Ishida M, Iwai Y, Tanaka Y, Okazaki T, Freeman GJ, Minato N, et al. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunology letters*. 2002 Oct 21;84(1):57-62.
- Liang SC, Latchman YE, Buhmann JE, Tomczak MF, Horwitz BH, Freeman GJ, et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *European journal of immunology*. 2003 Oct;33(10):2706-16.
- Petroff MG, Chen L, Phillips TA, Azzola D, Sedlmayr P, Hunt JS. B7 family molecules are favorably positioned at the human maternal-fetal interface. *Biology of reproduction*. 2003 May;68(5):1496-504.

- Wiendl H, Mitsdoerffer M, Schneider D, Melms A, Lochmuller H, Hohlfeld R, et al. Muscle fibres and cultured muscle cells express the B7.1/2-related inducible co-stimulatory molecule, ICOSL: implications for the pathogenesis of inflammatory myopathies. *Brain*. 2003 May;126(Pt 5):1026-35.
- Loke P, Allison JP. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 Apr 29;100(9):5336-41.
- Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, et al. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *European journal of immunology*. 2002 Mar;32(3):634-43.
- Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 1999 Aug;11(2):141-51.
- Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science (New York, NY)*. 2001 Jan 12;291(5502):319-22.
- Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R, Mitsuiye T, Mizoguchi A, Wang J, et al. Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nature medicine*. 2003 Dec;9(12):1477-83.
- Prokunina L, Castillejo-Lopez C, Oberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V, et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nature genetics*. 2002 Dec;32(4):666-9.
- Dong H, Strome SE, Matteson EL, Moder KG, Flies DB, Zhu G, et al. Costimulating aberrant T cell responses by B7-H1 autoantibodies in rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation*. 2003 Feb;111(3):363-70.
- Nielsen C, Hansen D, Husby S, Jacobsen BB, Lillevang ST. Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. *Tissue antigens*. 2003 Dec;62(6):492-7.
- Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *Journal of virology*. 2003 Apr;77(8):4911-27.
- Wherry EJ, Ahmed R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *Journal of virology*. 2004 Jun;78(11):5535-45.
- Klenerman P, Hill A. T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nature immunology*. 2005 Sep;6(9):873-9.
- Wherry EJ, Blattman JN, Ahmed R. Low CD8 T-cell proliferative potential and high viral load limit the effectiveness of therapeutic vaccination. *Journal of virology*. 2005 Jul;79(14):8960-8.

Das S, Suarez G, Beswick EJ, Sierra JC, Graham DY, Reyes VE. Expression of B7-H1 on gastric epithelial cells: its potential role in regulating T cells during *Helicobacter pylori* infection. *J Immunol*. 2006 Mar 1;176(5):3000-9.

Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontology* 2000. 2004;34:9-21.

Kamma JJ, Nakou M, Gmur R, Baehni PC. Microbiological profile of early onset/aggressive periodontitis patients. *Oral microbiology and immunology*. 2004 Oct;19(5):314-21.

Papantonopoulos GH. Effect of periodontal therapy in smokers and non-smokers with advanced periodontal disease: results after maintenance therapy for a minimum of 5 years. *Journal of periodontology*. 2004 Jun;75(6):839-43.

Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, Pereira MS, Mortara RA, Brodskyn CI, et al. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *The Journal of infectious diseases*. 2006 May 1;193(9):1313-22.

Emingil G, Karaarslan F, Keskinoglu A, Coker I, Atilla G. Phenotypic and functional analysis of peripheral blood mononuclear cells in generalised aggressive and chronic periodontitis patients. *Journal of the International Academy of Periodontology*. 2001 Oct;3(4):87-94.

Champaiboon C, Yongvanitchit K, Pichyangkul S, Mahanonda R. The immune modulation of B-cell responses by *Porphyromonas gingivalis* and interleukin-10. *Journal of periodontology*. 2000 Mar;71(3):468-75.

Zadeh HH, Tanavoli S, Haines DD, Kreutzer DL. Despite large-scale T cell activation, only a minor subset of T cells responding in vitro to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* differentiate into effector T cells. *Journal of periodontal research*. 2000 Jun;35(3):127-36.

Taylor JJ, Preshaw PM, Donaldson PT. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2004;35:158-82.

Garlet GP, Avila-Campos MJ, Milanezi CM, Ferreira BR, Silva JS. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2005 Apr;7(4):738-47.

Loesche WJ. Bacterial mediators in periodontal disease. *Clin Infect Dis*. 1993 Jun;16 Suppl 4:S203-10.

Gaumer HR, Holm-Pedersen P, Folke LE. Indirect blastogenesis of peripheral blood leukocytes in experimental gingivitis. *Infection and immunity*. 1976 May;13(5):1347-53.

Lang NP, Smith FN. Lymphocyte response to T-cell mitogen during experimental gingivitis in humans. *Infection and immunity*. 1976 Jan;13(1):108-13.

Dutra WO, Martins-Filho OA, Cancado JR, Pinto-Dias JC, Brener Z, Gazzinelli G, et al. Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. *Scandinavian journal of immunology*. 1996 Jan;43(1):88-93.

Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annual review of immunology*. 2001;19:565-94.

Frauwirth KA, Thompson CB. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *The Journal of clinical investigation*. 2002 Feb;109(3):295-9.

Riley JL, Schlienger K, Blair PJ, Carreno B, Craighead N, Kim D, et al. Modulation of susceptibility to HIV-1 infection by the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 costimulatory molecule. *The Journal of experimental medicine*. 2000 Jun 5;191(11):1987-97.

Schlotmann T, Waase I, Julch C, Klauenberg U, Muller-Myhsok B, Dietrich M, et al. CD4 alpha beta T lymphocytes express high levels of the T lymphocyte antigen CTLA-4 (CD152) in acute malaria. *The Journal of infectious diseases*. 2000 Jul;182(1):367-70.

Kosmaczewska A, Frydecka I, Bocko D, Ciszak L, Teodorowska R. Correlation of blood lymphocyte CTLA-4 (CD152) induction in Hodgkin's disease with proliferative activity, interleukin 2 and interferon-gamma production. *British journal of haematology*. 2002 Jul;118(1):202-9.

Wahl SM, Hunt DA, Wong HL, Dougherty S, McCartney-Francis N, Wahl LM, et al. Transforming growth factor-beta is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation. *J Immunol*. 1988 May 1;140(9):3026-32.

Silva JS, Twardzik DR, Reed SG. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *The Journal of experimental medicine*. 1991 Sep 1;174(3):539-45.

Campanelli AP, Silva JS. Modulação da resposta imune e inflamatória após a infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*. Ribeirão Preto - SP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2003.

Sullivan TJ, Letterio JJ, van Elsas A, Mamura M, van Amelsfort J, Sharpe S, et al. Lack of a role for transforming growth factor-beta in cytotoxic T lymphocyte antigen-4-mediated inhibition of T cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001 Feb 27;98(5):2587-92.

van Den Broek M, Bachmann MF, Kohler G, Barner M, Escher R, Zinkernagel R, et al. IL-4 and IL-10 antagonize IL-12-mediated protection against acute vaccinia virus infection with a limited role of IFN-gamma and nitric oxide synthetase 2. *J Immunol*. 2000 Jan 1;164(1):371-8.

Owens JM, Gallagher AC, Chambers TJ. IL-10 modulates formation of osteoclasts in murine hemopoietic cultures. *J Immunol*. 1996 Jul 15;157(2):936-40.

Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Britti D, De Maio M, et al. Absence of endogenous interleukin-10 enhances the evolution of murine type-II collagen-induced arthritis. *European cytokine network*. 2001 Oct-Dec;12(4):568-80.

Al-Rasheed A, Scheerens H, Srivastava AK, Rennick DM, Tatakis DN. Accelerated alveolar bone loss in mice lacking interleukin-10: late onset. *Journal of periodontal research*. 2004 Jun;39(3):194-8.

Saidenberg-Kermanac'h N, Bessis N, Lemeiter D, de Vernejoul MC, Boissier MC, Cohen-Solal M. Interleukin-4 cellular gene therapy and osteoprotegerin decrease inflammation-associated bone resorption in collagen-induced arthritis. *Journal of clinical immunology*. 2004 Jul;24(4):370-8.

Gimenez MF, Tausk F, Gimenez MM, Gigli I. Langerhans' cells in paracoccidioidomycosis. *Archives of dermatology*. 1987 Apr;123(4):479-81.

Seguier S, Godeau G, Brousse N. Immunohistological and morphometric analysis of intra-epithelial lymphocytes and Langerhans cells in healthy and diseased human gingival tissues. *Archives of oral biology*. 2000 Jun;45(6):441-52.

Seguier S, Bodineau A, Godeau G, Pellat B, Brousse N. Langerin+ versus CD1a+ Langerhans cells in human gingival tissue: a comparative and quantitative immunohistochemical study. *Archives of oral biology*. 2003 Apr;48(4):255-62.

Seymour GJ, Greenspan JS. The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease. *Journal of periodontal research*. 1979 Jan;14(1):39-46.

Seymour GJ, Powell RN, Cole KL, Aitken JF, Brooks D, Beckman I, et al. Experimental gingivitis in humans. A histochemical and immunological characterization of the lymphoid cell subpopulations. *Journal of periodontal research*. 1983 Jul;18(4):375-85.

Gemmell E, Seymour GJ. Gamma delta T lymphocytes in human periodontal disease tissue. *Journal of periodontology*. 1995 Sep;66(9):780-5.

Mathur A, Michalowicz BS. Cell-mediated immune system regulation in periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997;8(1):76-89.

Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clinical and experimental immunology*. 2007 Jan;147(1):128-38.

Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC. CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infection and immunity*. 1999b Jun;67(6):2804-9.

Kageyama Y, Koide Y, Yoshida A, Uchijima M, Arai T, Miyamoto S, et al. Reduced susceptibility to collagen-induced arthritis in mice deficient in IFN-gamma receptor. *J Immunol*. 1998 Aug 1;161(3):1542-8.

Butler DM, Malfait AM, Maini RN, Brennan FM, Feldmann M. Anti-IL-12 and anti-TNF antibodies synergistically suppress the progression of murine collagen-induced arthritis. *European journal of immunology*. 1999 Jul;29(7):2205-12.

Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Cytokines in rheumatoid arthritis. *Current rheumatology reports*. 2002 Jun;4(3):208-17.

Mauri C, Feldmann M, Williams RO. Down-regulation of Th1-mediated pathology in experimental arthritis by stimulation of the Th2 arm of the immune response. *Arthritis and rheumatism*. 2003 Mar;48(3):839-45.

Janeway CA, Jr. How the immune system protects the host from infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2001 Nov;3(13):1167-71.

Dutton RW, Bradley LM, Swain SL. T cell memory. *Annual review of immunology*. 1998;16:201-23.

Lee W, Pankoski L, Zekavat A, Shenker BJ. *Treponema denticola* immunoinhibitory protein induces irreversible G1 arrest in activated human lymphocytes. *Oral microbiology and immunology*. 2004 Jun;19(3):144-9.