

**ANA CARLA ROBATTO NUNES**

**O papel de Aae na adesão às proteínas de matriz extracelular e sua influência nas propriedades hidrofóbicas e formação de biofilme por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Profa. Dra. Marcia P. Alves Mayer

**São Paulo  
2009**

## RESUMO

Nunes, ACR. O papel de Aae na adesão às proteínas de matriz extracelular e sua influência nas propriedades hidrofóbicas e na formação de biofilme por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. 2009. 75 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O microrganismo gram-negativo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, fortemente associado a quadros de periodontite agressiva, coloniza a cavidade oral, aderindo e invadindo as células epiteliais, bem como participando da formação de biofilme nas superfícies do hospedeiro. *A. actinomycetemcomitans* expressa Aae, uma proteína de superfície, relacionada com a adesão às células epiteliais. Este estudo avaliou o papel de Aae na adesão a outros substratos, tais como proteínas da matriz extracelular colagenosas e não-colagenosas, hidroxiapatita recoberta por saliva (SHA) e na formação do biofilme. Um mutante nulo em *aae* foi construído e o fenótipo comparado com o da linhagem selvagem *A. actinomycetemcomitans* VT1169. A amostra mutante deficiente em *aae* exibiu significativa redução na adesão às células epiteliais quando cultivada em microaerofilia, tanto em início quanto em final de fase exponencial. Quando cultivados até início e final de fase exponencial, em microaerofilia e anaerobiose, o mutante nulo em *aae* apresentou-se menos hidrofóbico que a linhagem parental. A formação de biofilme pela a linhagem mutante foi menor que a selvagem, em ambas as atmosferas, variando a concentração do inóculo, o tempo de incubação e a fase de crescimento. A adesão à SHA também foi afetada pela interrupção do gene *aae*, sendo menor para a amostra mutante. A capacidade de adesão ao colágeno V e à fibronectina foi fracamente afetada pela interrupção do gene *aae*. Entretanto, o mutante nulo em *aae* exibiu uma habilidade diminuída de aderir à laminina, colágeno I, III e IV. Estes dados sugerem que Aae desempenha um importante papel na colonização da cavidade oral pelo *A. actinomycetemcomitans*, não somente promovendo sua adesão às células epiteliais, mas também mediando a adesão a outros substratos.

**Palavras-chave:** Aae. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Adesão. Proteínas de matriz extracelular. Formação de biofilme. Hidrofobicidade.

## ABSTRACT

Nunes, ACR. The role of Aae in mediating adhesion to extracellular matrix proteins and its influence on hydrophobic properties and biofilm formation by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. 2009. 75 p. Ph. D. Thesis - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The gram-negative microorganism *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, associated with aggressive periodontitis, colonizes the oral cavity by binding to and invading epithelial cells and by participating in biofilms formed in hard surfaces. *A. actinomycetemcomitans* express Aae, a surface protein, implicated in the adhesion to epithelial cells. This study evaluated the role of Aae in the adhesion to other substrates such as collagen and non-collagen extracellular matrix proteins and saliva coated hydroxyapatite (SHA), and in biofilm formation. A null mutant in *aae* was constructed and its behavior was compared with the wild type strain *A. actinomycetemcomitans* VT1169. The *aae* deficient mutant exhibited a decreased ability to bind to epithelial cells when cultivated until early and late log phases, under microaerophilic atmosphere. The null mutant was less hydrophobic than the parental strain, either under microaerophilic or anaerobic atmospheres, until early and late log phases. The mutant strain formed less biofilm than the wild type, even varying the atmosphere, inocula concentration, incubation time and grown phase. The adhesion to SHA was affected by the *aae* interruption, and was lower in the null mutant. The abilities to bind to collagen V and fibronectin were very poorly affected by *aae* interruption. However, the null *aae* mutant exhibited a decreased ability to adhere to laminin, collagen I, III and IV. These data suggest that Aae may play an important role in the colonization of the oral cavity by *A. actinomycetemcomitans*, not only by promoting its adhesion to epithelial cells, but by mediating adhesion to other substrates.

**Key words:** Aae. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Adhesion. Extracellular matrix proteins. Biofilm formation. Hydrophobicity.

## 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, anteriormente classificado como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Norskov-Lauritsen, Kilian, 2006), consiste em um cocobacilo gram-negativo, imóvel, não esporulado, anaeróbio facultativo, comumente encontrado na cavidade bucal de humanos (Wilson, Henderson, 1995). Tem como principal habitat o biofilme presente no sulco gengival/bolsa periodontal, sendo também isolado da placa supragengival, mucosa oral, língua, saliva e tonsilas palatinas de seres humanos (Asikainen, Chen, 1999; Fine et al., 2006). Este microrganismo apresenta íntima ligação com a etiologia de quadros severos de periodontite agressiva (Fine et al., 2006), principalmente na sua forma localizada (Fine et al., 2007). Embora *A. actinomycetemcomitans* seja detectado com maior frequência e em elevado número na cavidade bucal de pacientes doentes, uma relevante proporção de indivíduos saudáveis também apresenta este microrganismo (Wilson, Henderson, 1995).

A doença periodontal parece ser um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Sakurai et al., 2007). *A. actinomycetemcomitans* relaciona-se com infecções extra-sítios bucais (Zambon, 1985), como endocardite, abscessos cerebrais, pneumonia, osteomielites e infecções do trato urinário. A maioria das doenças extra-bucais parece ocorrer como resultado de uma disseminação hematogênica de origem periodontal (Fives-Taylor et al., 1999).

Fatores de virulência são propriedades que permitem uma espécie bacteriana colonizar um órgão alvo, ultrapassando as defesas do hospedeiro e causando dano tecidual (Socransky, Haffajee, 1991). *A. actinomycetemcomitans* apresenta uma grande variedade de fatores de virulência, o que lhe confere capacidade para aderir, invadir, evadir das defesas do hospedeiro, destruir tecidos e inibir o processo de reparação (Wilson, Henderson, 1995; Fine et al., 2006).

Para que a colonização bacteriana ocorra, deve haver inicialmente a adesão do microrganismo ao epitélio do hospedeiro (Pizarro-Cerdá, Cossart, 2007). Após a adesão, alguns microrganismos são capazes de invadir células não fagocíticas, como células epiteliais e fibroblastos (Meyer, Sreenivasan, Fives-Taylor, 1991; Meyer, Lippmann, Fives-Taylor, 1996; Gutiérrez-Venegas et al., 2007).

A cavidade bucal consiste em um ambiente dinâmico, no qual forças mecânicas originadas pelo fluxo salivar e do fluido gengival, da fala e ingestão de alimentos e fatores de químicos, como concentração iônica e variações de temperatura, podem influenciar o processo de adesão (Fives-Taylor, Meyer, Mintz, 1995; Fives-Taylor, Meyer, Mintz, 1996).

A maioria das linhagens de *A. actinomycetemcomitans* apresenta aderência às células KB e a outras células epiteliais (Rose, Meyer, Fives-Taylor, 2003; Yue et al., 2007). A adesão ocorre rapidamente, nos primeiros dez minutos, alcançando saturação uma hora após a infecção (Meyer, Fives-Taylor, 1994; Fives-Taylor, Meyer, Mintz, 1996). A adesão de *A. actinomycetemcomitans* às células KB apresenta variabilidade na sua magnitude entre as diferentes linhagens e pode ser influenciada pela fase de crescimento bacteriano, estado físico do meio (caldo ou ágar), temperatura e quantidade de CO<sub>2</sub>. É ainda dependente do tempo e da concentração bacteriana em contato com as células eucariontes (Mintz, Fives-Taylor, 1994; Fives-Taylor, Meyer, Mintz, 1995). O tratamento prévio de *A. actinomycetemcomitans* com fluídos fisiológicos, como saliva e plasma, reduz a sua adesão às células epiteliais (Fives-Taylor, Meyer, Mintz, 1995; Fives-Taylor, Meyer, Mintz, 1996). As interações iônicas representam um fator importante nesse processo, já que concentrações de cloreto de sódio acima da encontrada fisiologicamente, provocam significantes reduções na capacidade de adesão bacteriana. *A. actinomycetemcomitans* adere às células epiteliais em diferentes temperaturas, porém uma marcante adesão é observada a 37 °C (Meyer, Fives-Taylor, 1994). O pH não parece interferir nesse mecanismo, já que somente um pH muito alcalino (em torno de 10) promove redução da adesão. (Mintz, Fives-Taylor, 1994; Fives-Taylor, Meyer, Mintz, 1996).

A adesão de *A. actinomycetemcomitans* aos tecidos orais é mediada por interações específicas e não específicas, com a participação de um ou mais fatores. As interações não específicas relacionam-se com os genes do operon *flp-rcp-tad* (Tomich, Planet, Figursky, 2007), os quais possibilitam a adesão deste microrganismo a diversas superfícies biológicas ou abióticas (Kachlany et al., 2001). O locus *tad* (*tight adherence*) codifica a subunidade da fimbria e seu sistema de transporte molecular, propiciando uma adesão efetiva de *A. actinomycetemcomitans* às superfícies do hospedeiro e formação a de biofilmes (Perez et al., 2006). Pelo menos 12 genes que compõem o locus *tad* estão envolvidos na aderência do fenótipo rugoso, propiciando a produção de pili Flp, autoagregação e formação de biofilme (Tomich, Planet, Figursky, 2007).

As subunidades repetidas de 6.5-kDa de Flp-1 compõem o pili tipo IV (Kachlany et al., 2001). Variantes não fimbriadas, que exibem morfologia lisa de colônia, frequentemente apresentam mutações na região promotora *flp*, sendo o nível de expressão desta região, aproximadamente cem vezes menor no fenótipo liso, do que no fenótipo rugoso (Wang, Liu, Chen, 2005). Estas variantes lisas aderem às células epiteliais, cuja adesão é mediada por componentes adesinas não fimbriais.

Uma classe de adesinas denominadas autotransportadas é observada em bactérias gram-negativas da família *Pasteurellaceae*, gêneros *Haemophilus*, *Aggregatibacter* e *Pasteurella* (Rose, Meyer, Fives-Taylor, 2003). Nas bactérias gram-negativas, as proteínas extracelulares devem atravessar a membrana interna, o espaço periplasmático, atingindo a superfície celular após atravessar a membrana externa (Wells et al., 2007). As proteínas autotransportadas mediam seu transporte através da membrana celular e, conseqüentemente, sua própria secreção através do mecanismo de secreção do tipo V (Henderson, Capello, Nataro, 2000; Henderson et al., 2000). Estas proteínas apresentam um domínio C-terminal (domínio translocador), integrado à superfície bacteriana e um domínio N-terminal (domínio passageiro), exposto na superfície celular (Henderson, Nataro, 2001). Estas proteínas apresentam uma grande variação no domínio passageiro, explicando a vasta função efetora, como adesão, invasão, formação de biofilme, autoagregação e citotoxicidade (Henderson et al., 2004; Wells et al., 2007).

Duas classes distintas de proteínas autotransportadas foram identificadas: a convencional, a qual apresenta 12  $\beta$ -cadeias formando o  $\beta$ -barril, e as que possuem 4  $\beta$ -cadeias e necessitam trimerizar para a formação do poro de passagem. O domínio passageiro das proteínas autotransportadas convencionais sofre, geralmente, a ação proteolítica, sendo liberada no meio. Já o domínio das triméricas permanece covalentemente ligado ao domínio translocador (Fine et al., 2006).

Três proteínas autotransportadas foram identificadas em *A. actinomycetemcomitans*: Aae, ApiA e EmaA (Rose, Meyer, Fives-Taylor, 2003; Mintz, 2004; Fine et al., 2005; Fine et al., 2006; Ruiz et al., 2006; Yue et al., 2007).

Aae apresenta 886 aminoácidos e, apesar de possuir alguma homologia com as proteínas autotransportadas de espécies do gênero *Neisseria* e *Haemophilus*, esta parece ser uma versão truncada das suas homólogas Hap e IgA1 protease de *Haemophilus influenzae* (Rose, Meyer, Fives-Taylor, 2003).

Hap consiste em uma proteína autotransportada, relacionada com a atividade adesiva bacteriana, que auxilia na invasão das células epiteliais humanas, na agregação e formação de microcolônias, na formação do biofilme bacteriano e na evasão bacteriana dos mecanismos do sistema imune local (Henderson, Nataro, 2001). Esta proteína apresenta três domínios distintos: uma seqüência sinal amino-terminal, um domínio interno passageiro de 110k-Da, chamado de Hap<sub>s</sub> e um domínio carboxi-terminal de 45k-Da, denominado domínio translocador ou Hap<sub>β</sub>. Este se insere na membrana externa, sob conformação de poro ( $\beta$ -barril), possibilitando a apresentação de Hap<sub>s</sub> na superfície do microorganismo (Hendrixson et al., 1997). O terço final da porção C-terminal (resíduos 726-1036), domínio Hap<sub>s</sub>, é responsável pela atividade de adesão bacteriana com as células epiteliais do trato respiratório e pela agregação bacteriana. Nesta porção C-terminal são encontrados um domínio relacionado com a aderência bacteriana a fibronectina, e outros dois domínios relacionados com a adesão à laminina e ao colágeno IV. Já o módulo N-terminal contém a atividade de serina protease, que media sua clivagem proteolítica, resultando na separação do domínio Hap<sub>β</sub> e consequente liberação para o meio extracelular (Fink, Green, St Geme, 2002; Fink et al., 2003). Enquanto permanece associado ao microorganismo, o domínio Hap<sub>s</sub> desempenha suas funções de adesão às células epiteliais, agregação e formação de micro-colônias. A mutação no sítio da atividade de serina protease (Hendrixson, St Geme, 1998) ou o uso de inibidores de serina protease (Hendrixson et al., 1997) são capazes de inibir a liberação do Hap<sub>s</sub> da superfície bacteriana, aumentando a aderência às células epiteliais e às proteínas da matriz extracelular.

Aae e Hap apresentam maior homologia na porção C-terminal que codifica a porção autotransportada (Anexo). O domínio translocador de Aae apresenta 28% de homologia na seqüência de aminoácidos que compõe os domínios translocadores de IgA1 protease e Hap de *H. influenzae* e 22% ao de IgA1 protease de *Neisseria*, enquanto o domínio N-terminal não apresenta identidade significativa com outras proteínas autotransportadas listadas, no *GenBank*. Aae não apresenta sítio catalítico relacionado à atividade de serina protease presente nas IgA1 proteases de *Neisseria* e *Haemophilus* e Hap de *Haemophilus*, indicando que a adesina Aae permanece ligada à parede celular em *A. actinomycetemcomitans* (Rose, Meyer, Fives-Taylor, 2003; Fine et al., 2006).

A proteína Aae está envolvida com a adesão bacteriana às células epiteliais, já que a linhagem mutante de *A. Actinomycetemcomitans*, defectiva em *aae*, apresentou uma redução de 50% na adesão às células epiteliais KB, quando comparada à linhagem selvagem

(Rose, Meyer, Fives-Taylor, 2003). Utilizando-se uma linhagem mutante em *aae*, foi demonstrado que Aae possibilita a adesão deste microrganismo também às células bucais epiteliais (BEC). Constatou-se que Aae media a adesão de *A. Actinomycetemcomitans* às células epiteliais de primatas do Velho Mundo e humanos, porém o mesmo não foi observado em primatas do Novo Mundo e na maioria dos mamíferos não-primatas (Fine et al., 2005).

Experimentos utilizando células epiteliais bucais (BEC) demonstraram a especificidade de Aae às células humanas e de outros primatas. Observou-se que um *plateau* de células bacterianas foi atingido quando alta concentração de células de *E. coli*, expressando *aae*, foi adicionada às células BEC, indicando saturação dos sítios de adesão destas. O mesmo não foi observado quando as amostras selvagem e mutante em *aae* de *A. actinomycetemcomitans* foram adicionadas às BEC, sugerindo a ocorrência de interações mais complexas. A possibilidade de interações hidrofóbicas e mediadas por *flp-1* na autoagregação não pode ser descartada, tratando-se da linhagem selvagem de *A. actinomycetemcomitans*, variante de fenótipo rugoso (Fine et al., 2005; Fine et al., 2006).

Embora a cavidade oral de humanos seja o reservatório principal para *A. actinomycetemcomitans*, este também foi isolado de cavidades orais de vacas e ratos (Yue et al., 2007). Não se observou redução na adesão da *knock-out* em *aae* às células epiteliais orais isoladas de rato e vaca, sugerindo a participação de outras adesinas ou moléculas de superfície no processo. A proteína Aae possivelmente reconhece um receptor presente na superfície das BEC de primatas antigos e de humanos (Fine et al., 2005).

A adesina ApiA de *A. actinomycetemcomitans*, também conhecida como Omp100 (Ouhara et al., 2006), está envolvida no processo de adesão às células epiteliais. ApiA apresenta correlação filogenética com NadA, de *Neisseria meningitides* e adesina UspA de *Moraxella catarrhalis* (Fine et al., 2006). Assim como Aae, ApiA está relacionada com a adesão às células epiteliais humanas e ambas parecem apresentar uma redundância funcional. Linhagens deficientes em *aae* ou *apiA* exibiram valores reduzidos de adesão às BEC, quando comparadas à linhagem selvagem, enquanto que uma inibição total na adesão foi observada, utilizando-se uma mutante deficiente em *aae/apiA* (Yue et al., 2007). O pré-tratamento de uma amostra selvagem de *A. actinomycetemcomitans* com um anti-soro específico para ApiA, previamente ao experimento de adesão, resultou apenas na redução e não na eliminação da adesão bacteriana às células BEC. Desde que ApiA e Aae não apresentam homologia entre seus domínios de superfície, uma reação cruzada entre o antisoro ApiA e Aae não era esperada (Yue et al., 2007).



A adesina EmaA, também uma proteína autotransportada de *A. actinomycetemcomitans*, está envolvida com a adesão da bactéria ao colágeno, particularmente ao colágeno tipo V e à fibronectina. Porém, esta propriedade não parece ser exclusiva de EmaA, pois uma linhagem deficiente em *emaA* apresenta efeito residual na adesão a esses substratos (Mintz, 2004; Fine et al., 2006), sugerindo a participação de Aae neste processo.

A matriz extracelular é uma estrutura estável, encontrada sob as células epiteliais e endoteliais, além de circundar o tecido conjuntivo. Apresenta funções estruturais e de filtração muito importantes, além de estar envolvida no metabolismo e diferenciação celular. É formada basicamente pela substância amorfa constituída por proteoglicanos, glicosaminoglicanos e glicoproteínas de adesão, como fibronectina e laminina e por fibras colágenas (Weber, 1992).

A membrana basal consiste em uma estrutura heterogênea, altamente especializada, eletro-densa, originada pela fusão de várias camadas de proteínas extracelulares, adjacentes ou circundantes a uma grande variedade de células, responsável por manter a arquitetura tecidual (Weber, 1992). Além da laminina, as membranas basais são formadas por vários tipos de colágeno, proteoglicanos, proteínas de adesão dependentes de cálcio e outras proteínas adesivas e estruturais. O colágeno tipo IV é o maior componente colagenoso da membrana basal, formando um arcabouço para dar estabilidade mecânica aos seus outros componentes (DeCarlo et al., 2008). A rede composta pela laminina é principalmente de natureza não covalente e é provavelmente mais dinâmica que a do colágeno IV. As duas redes estão aparentemente conectadas pelo nidógeno, uma proteína que, em conjunto com outros componentes, estabiliza a estrutura em rede que compõe a membrana basal (Timpl, 1996). A membrana basal age como uma barreira contra a invasão microbiana, porém quando os tecidos estão inflamados ou degenerados, a matriz protéica é exposta, provavelmente possibilitando os processos de adesão e, conseqüentemente, a invasão bacteriana (Winkler et al., 1987; Hillmann et al., 1998).

O principal componente da matriz extracelular é o colágeno, composto de três cadeias polipeptídicas enroladas umas sobre as outras, originando uma conformação de tripla-hélice. Os tipos de colágeno predominantes no tecido conjuntivo são: I, II, III, V e XI, os quais são classificados como fibrilares (Weber, 1992).

O colágeno I é o mais abundante tipo de colágeno existente no corpo humano. É encontrado nos tecidos conjuntivos exceto na cartilagem, pele, parede de artérias, ossos e dentes (dentina, cemento e ligamento periodontal) (Becker et al., 1991; Mintz, Fives-Taylor, 1999).

O colágeno tipo III é o segundo mais abundante tipo de colágeno no corpo humano e ocorre particularmente nos tecidos que exibem propriedades elásticas, a exemplo da pele, vasos sanguíneos e vários órgãos internos. É componente importante das fibras do ligamento periodontal (Becker et al., 1991; Mintz, Fives-Taylor, 1999).

O colágeno do tipo V encontra-se distribuído nos tecidos intersticiais, incluindo o ligamento periodontal (Becker et al., 1991) e a matriz extracelular da aorta mediana (Dingemans et al., 2000). Em tecidos inflamados seu conteúdo fica aumentado (Narayanan, Clagett, Page, 1985).

A laminina e a fibronectina, proteínas não colágenas, altamente glicosiladas, também são encontradas na composição da membrana basal (Weber, 1992). A fibronectina desempenha importante papel na adesão celular, através da interação de sítios de adesão específicos. Ela existe sob duas formas: celular, presente nos tecidos e não fibrilar, forma solúvel produzida por hepatócitos e secretada na corrente sanguínea (Mosher, 1984).

*A. actinomycetemcomitans* é encontrado na profundidade do tecido conjuntivo, em contato com fibras colágenas, no periodonto de indivíduos que apresentam a forma agressiva da doença, indicando a ocorrência de colonização bacteriana nos tecidos subepiteliais (Christersson et al., 1987). Assim, as proteínas da matriz extracelular podem representar substratos em potencial para a adesão e posterior invasão dessas bactérias.

*A. actinomycetemcomitans* apresenta adesão às proteínas da matriz extracelular, como por exemplo: à fibronectina, à laminina e ao colágeno IV (Winkler et al., 1987). A adesão bacteriana aos colágenos fibrilares como I, II, III e V apresentou maior magnitude do que ao do tipo IV, sugerindo que a adesão ao colágeno pode ser dependente de sua conformação (Mintz, Fives-Taylor, 1999).

Dentre os colágenos fibrilares, a adesão do *A. actinomycetemcomitans* ao colágeno tipo V é um pouco maior que à do tipo I, o mais abundante colágeno no corpo humano. Com a inflamação crônica dos tecidos gengivais na periodontite, ocorre decréscimo na quantidade total de colágeno e um aumento proporcional do tipo V, o que poderia favorecer a adesão bacteriana e a progressão da doença (Narayanan, Clagett, Page, 1985; Mintz, Fives-Taylor,

1999). A adesão bacteriana ao colágeno do tipo III é reduzida quando comparada à do tipo I. O tipo II, colágeno basicamente encontrado em cartilagens, não parece consistir substrato para a adesão do *A. actinomycetemcomitans*. A existência de variação na capacidade de adesão ao colágeno entre as linhagens de *A. actinomycetemcomitans* sugere diferenças nas proteínas externas de membrana responsáveis por essa adesão (Mintz, Fives-Taylor, 1999).

Foi demonstrado também que *A. actinomycetemcomitans* adere às pérolas de hidroxiapatita cobertas e não cobertas com saliva (Kagermeier, London, 1985; Fine et al., 1999a; Fine et al., 1999b), porém a adesão é melhor na superfície não coberta por saliva (Fine et al., 1999b), que é representada pela adesão a superfícies abióticas, mediada pela fimbria. Como descrito anteriormente neste capítulo, a fimbria é expressa principalmente nas linhagens rugosas, obtidas de isolados clínicos recentes, que apresentam maior capacidade de adesão do que as variantes lisas (Fine et al., 1999a; Fine et al., 1999b), como consequência da expressão dos genes *flp-rcp-tad* neste fenótipo.

A colonização e a persistência de bactérias na cavidade oral dependem da sua capacidade em aderir às superfícies orais como película adquirida, bactérias co-habitantes e células epiteliais. No biofilme, as bactérias têm acesso a nutrientes, ocorrendo intensa troca de metabólitos e encontram-se mais protegidas das variações do meio ambiente, da atuação de antibióticos e do sistema imune (Inoue et al., 2003; Haase et al., 2006). A matriz polimérica extracelular possibilita que as células do biofilme tenham um microambiente rico em nutrientes, enzimas e outras moléculas biológicas, bem como de substâncias abióticas originárias do meio externo (Kaplan et al., 2004), que passam através de microcanais presentes no biofilme (Ramasubbu et al., 2005).

Foi demonstrado que poli-N-acetil-glicosamina (PGA) é um dos principais componentes da matriz do biofilme, produzido pelo *A. actinomycetemcomitans* atuando na agregação das células bacterianas. O locus *pgaABCD* de *A. actinomycetemcomitans* codifica a produção de um polissacarídeo extracelular, de alto peso molecular, estrutural e funcionalmente relacionado ao PGA de *E. coli* e à PIA de *Staphylococcus epidermidis*, que também é substrato natural da enzima dispersina B (Kaplan et al., 2004). A dispersina B produzida por *A. actinomycetemcomitans*, codificada pelo gene *dspB*, causa a desagregação das células bacterianas que compõem o biofilme, com consequente destacamento destas, possibilitando a expansão do biofilme para outras superfícies (Ramasubbu et al., 2005; Fine et al., 2006). As mutantes *pgaC* são sensíveis à proteinase K, o que sugere que PGA pode atuar como uma barreira física e/ou química, prevenindo o acesso de agentes externos ao biofilme,

o que poderia, por exemplo, aumentar a resistência aos agentes microbianos (Kaplan et al., 2004).

*A. actinomycetemcomitans* desenvolve no biofilme colônias assimétricas, lobuladas, as quais apresentam características arquiteturas complexas, sendo formado por uma camada de células densamente compactadas no exterior da colônia, bem como por células não agregadas, com presença de espaços no interior da colônia. Colônias de biofilme maduro soltam células únicas ou pequenos aglomerados no meio de cultura. Estas células, únicas ou agrupadas, aderem à superfície do tubo e formam novas colônias, o que favorece a expansão do biofilme (Kaplan, Meyenhofer, Fine, 2003). O fenótipo rugoso de *A. actinomycetemcomitans* se auto-agrega em meio líquido e possui a capacidade de formação de grande quantidade de biofilme, composto por células bem unidas, formado por torres de microcolônias ancoradas por uma pequena área de contato. Já a variante lisa, não fimbriada, apresenta crescimento homogêneo em meio líquido, porém é formadora de menor quantidade de biofilme, o qual apresenta uma arquitetura aberta, com peso reduzido, quando comparada à sua variante rugosa (Haase et al., 2006).

É possível que diferentes amostras de *A. actinomycetemcomitans* utilizem variados tipos de adesinas no processo de formação de biofilme (Fujise et al., 2008). Foi sugerido que a síntese de antígeno O do lipopolissacarídeo (O-PS) participaria da dispersão do biofilme, mas não estaria envolvido na adesão ou formação de colônias (Kaplan, Meyenhofer, Fine, 2003; Fujise et al., 2008). Em estudo recente utilizando variante lisa, pertencente ao sorotipo a, foi observado que a deleção no gene O-PS resultou em fenótipo incapaz de formar biofilme em superfícies abióticas, sugerindo a sua participação na adesão de *A. actinomycetemcomitans* (Fujise et al., 2008).

Em resumo, os estudos demonstraram que a adesina Hap, que tem homologia parcial com Aae, apresenta mais de um domínio relacionado à adesão e que esta participa de processos como formação de biofilme e interação com diferentes substratos em *H. Influenzae*. Por outro lado, foi também demonstrada a atividade residual de adesão a proteínas da matriz extracelular, apresentadas por mutante de *A. actinomycetemcomitans* nula na expressão da adesina EmaA. Assim, formulou-se a hipótese de que Aae poderia estar envolvida em outros processos de interação com proteínas do hospedeiro, além da sua conhecida interação com células epiteliais.

O presente estudo objetiva verificar o possível envolvimento de Aae no processo de adesão de *A. actinomycetemcomitans* à hidroxiapatita recoberta com saliva, na formação de biofilme e na interação com as proteínas de matriz extracelular, comparando o desempenho de uma amostra deficiente em *aae* com sua linhagem parental selvagem.

## 6 CONCLUSÃO

Estudos prévios demonstraram que Aae é uma das proteínas envolvidas com a adesão às células epiteliais KB. Os dados do presente estudo sugerem que:

- Modificações na superfície celular provocada pela mutação de *aae* resultaram em um fenótipo mais hidrofílico quando comparada à amostra selvagem.
- A formação de biofilme foi reduzida na mutante deficiente em *aae* quando comparada à amostra selvagem.
- A capacidade da adesão às SHA é maior para as amostras rugosas de *A. actinomycetemcomitans* do que para as variantes lisas.
- A amostra mutante deficiente em *aae* exibiu uma marcante redução na adesão a laminina e a outras proteínas, particularmente os colágenos tipos I, III e IV, sugerindo a que esta poderia representar um importante substrato na adesão mediada por Aae.

## REFERÊNCIAS\*

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore, DD, Seidman JG, Smith JA. Struhl K. Short Protocols in Molecular Biology. Wiley Jonh & Sons Inc.; 1999a. p.1-29.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore, DD, Seidman JG, Smith JA. Struhl K. Short Protocols in Molecular Biology. Wiley Jonh & Sons Inc. ; 1999b. p.2-12.

Asikainen S, Chen C. Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. Periodontol 2000. 1999 Jun;20:65-81.

Becker J, Schuppan D, Rabanus J, Rauch R, Niechoy U, Gelderblom H. Immunoelectron microscopic localization of collagens type I, V, VI and of procollagen type III in human periodontal ligament and cementum. J Histochem Cytochem. 1991;39:103-10.

Clark WB, Lane MD, Beem JE, Bragg SL, Wheeler TT. Relative hydrophobicities of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii* strains and their adsorption to saliva-treated hydroxyapatite. Infect Immun. 1985 Mar;47(3):730-6.

Christersson LA, Wikesjö UM, Albin B, Zambon JJ, Genco RJ. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. II. Correlation between immunofluorescence and culture techniques. J Periodontol. 1987 Aug;58(8):540-5.

Davey ME, Costerton JW. Molecular genetics analyses of biofilm formation in oral isolates. Periodontol 2000. 2006;42(1):13-26.

Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science. 1998; 280(5361):295-8.

DeCarlo AA, Cohen JA, Aguado A, Glenn B.J Isolation and characterization of human gingival microvascular endothelial cells. Periodontal Res. 2008 Apr;43(2):246-54.

---

\* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Dingemans KP, Teeling P, Lagendijk J H, Becker AE. Extracellular matrix of the human aortic media: an ultrastructural histochemical and Immunohistochemical study of the adult aortic media. *Anat Rec.* 2000;258:1-14.

Fine DH, Furgang D, Kaplan J, Charlesworth J, Figurski DH. Tenacious adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain CU1000 to salivary-coated hydroxyapatite. *Arch Oral Biol.* 1999a Dec;44(12):1063-76.

Fine DH, Furgang D, Schreiner HC, Goncharoff P, Charlesworth J, Ghazwan G, Fitzgerald-Bocarsly P, Figurski DH. Phenotypic variation in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* during laboratory growth: implications for virulence. *Microbiology.* 1999b Jun;145(Pt 6):1335-47.

Fine DH, Kaplan JB, Kachlany SC, Schreiner HC. How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: A model for infectious diseases. *Periodontol* 2000. 2006;42:114-57.

Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K, Ferrandiz J, Nasri C, McKiernan M, Gunsolley J. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *J Clin Microbiol.* 2007 Dec;45(12):3859-69.

Fine DH, Velliyagounder K, Furgang D, Kaplan JB. The *Actinobacillus actinomycetemcomitans* autotransporter adhesin Aae exhibits specificity for buccal epithelial cells from humans and old world primates. *Infect Immun.* 2005 Apr; 73(4):1947-53.

Fink DL, Buscher AZ, Green B, Fernsten P, St Geme JW 3rd. The *Hemophilus influenzae* Hap autotransporter mediates microcolony formation and adherence to epithelial cells and extracellular matrix via binding regions in the C-terminal end of the passenger domain. *Cell Microbiol.* 2003 Mar;5(3):175-86.

Fink DL, Green BA, St Geme JW 3rd. The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter binds to fibronectin, laminin, and collagen IV. *Infect Immun.* 2002 Sep;70(9):4902-7.

Fives-Taylor P, Meyer D, Mintz K. Characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* invasion of and adhesion to cultured epithelial cells. *Adv Dent Res.* 1995 Feb;9(1):55-62.

Fives-Taylor P, Meyer D, Mintz K. Virulence factors of the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol.* 1996 Mar;67(3):291-7.



Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol* 2000. 1999 Jun;20:136-67.

Fujise O, Wang Y, Chen W, Chen C. Adherence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* via serotype-specific polysaccharide antigens in lipopolysaccharides. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Jun;23(3):226-33.

Fulcher RA, Cole LE, Janowicz DM, Toffer KL, Fortney KR, Katz BP, Orndorff PE, Spinola SM, Kawula TH. Expression of *Haemophilus ducreyi* collagen binding outer membrane protein NcaA is required for virulence in swine and human challenge models of chancroid. *Infect Immun*. 2006 May;74(5):2651-8.

Gibbons RJ, Etherden I. Comparative hydrophobicities of oral bacteria and their adherence to salivary pellicles. *Infect Immun*. 1983 Sep;41(3):1190-6.

Gutiérrez-Venegas G, Kawasaki-Cárdenas P, Garcés CP, Román-Alvárez P, Barajas-Torres C, Contreras-Marmolejo LA. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* adheres to human gingival fibroblasts and modifies cytoskeletal organization. *Cell Biol Int*. 2007 Sep;31(9):1063-8.

Haase EM, Bonstein T, Palmer RJ Jr, Scannapieco FA. Environmental influences on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm formation. *Arch Oral Biol*. 2006 Apr; 51(4):299-314.

Harano K, Yamanaka A, Okuda K. An antiserum to a synthetic fimbrial peptide of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* blocked adhesion of the microorganism. *FEMS Microbiol Lett*. 1995 Aug 1;130(2-3):279-85.

Henderson IR, Cappello R, Nataro JP. Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion. *Trends Microbiol*. 2000 Dec;8(12):529-32.

Henderson IR, Nataro JP, Kaper JB, Meyer TF, Farrand SK, Burns DL, Finlay BB, St Geme, JW 3rd. Renaming protein secretion in the gram-negative bacteria. *Trends Microbiol*. 2000 Aug;8(8):352.

Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun*. 2001 Mar;69(3):1231-43.

Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004 Dec;68(4):692-744.

Hendrixson DR, de la Morena ML, Stathopoulos C, St Geme, JW 3rd. Structural determinants of processing and secretion of the *Haemophilus influenzae* Hap protein. *Mol Microbiol.* 1997 Nov;26(3):505-18.

Hendrixson DR, St Geme JW 3rd. The *Haemophilus influenzae* Hap serine protease promotes adherence and microcolony formation, potentiated by a soluble host protein. *Mol Cell.* 1998 Dec;2(6):841-50.

Hillmann G, Dogan S, Geurtsen W. Histopathological investigation of gingival tissue from patients with rapidly progressive periodontitis. *J Periodontol.* 1998;69:195-208.

Inoue T, Shingaki R, Sogawa N, Sogawa CA, Asami J, Koikeguchi S, Fukui K. Biofilm formation by a fimbriae-deficient mutant of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microbiol Immunol.* 2003;47(11):877-81.

Izano EA, Wang H, Raguath C, Ramasubbu N, Kaplan JB. Detachment and killing of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilms by dispersin B and SDS. *J Dent Res.* 2007;86(7):618- 22.

Kachlany SC, Planet PJ, Bhattacharjee MK, Kollia E, DeSalle R, Fine DH, Figurski DH. Nonspecific adherence by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* requires genes widespread in bacteria and archaea. *J Bacteriol.* 2000 Nov;182(21):6169-76.

Kachlany SC, Planet PJ, Desalle R, Fine DH, Figurski DH, Kaplan JB. *flp-1*, the first representative of a new pilin gene subfamily, is required for non-specific adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol Microbiol.* 2001 May;40(3):542-54.

Kagermeier AS, London J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains Y4 and N27 adhere to hydroxyapatite by distinctive mechanisms. *Infect Immun.* 1985 Mar;47(3):654-58.

Kaplan JB, Meyenhofer MF, Fine DH. Biofilm growth and detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Bacteriol.* 2003 Feb;185(4):1399-404.

Kaplan JB, Velliyagounder K, Raguath C, Rhode H, Mack D, Knobloch JK, Ramasubbu N. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *J Bacteriol.* 2004;186(24):8213-20.

Kyte J. The basis of the hydrophobic effect. *Biophys Chem.* 2003;100(1-3):193-203.

Meyer DH, Fives-Taylor PM. Characteristics of adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. *Infect Immun.* 1994 Mar;62(3):928-35.

Meyer DH, Lippmann JE, Fives-Taylor PM. Invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a dynamic, multistep process. *Infect Immun.* 1996 Aug;64(8):2988-97.

Meyer DH, Sreenivasan PK, Fives-Taylor PM. Evidence for invasion of human oral cell line by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 1991 Aug;59(8):2719-26.

Mintz KP, Brissette C, Fives-Taylor PM. A recombinase A-deficient strain of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* constructed by insertional mutagenesis using a mobilizable plasmid. *FEMS Microbiol Lett.* 2002 Jan 2;206(1):87-92.

Mintz KP, Fives-Taylor PM. Adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to a human oral cell line. *Infect Immun.* 1994 Sep;62(9):3672-8.

Mintz KP, Fives-Taylor PM. Binding of the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to extracellular matrix proteins. *Oral Microbiol Immunol.* 1999 Apr;14(2):109-16.

Mintz KP, Fives-Taylor PM. *impA*, a gene coding for an inner membrane protein, influences colonial morphology of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 2000 Dec;68(12):6580-6.

Mintz KP, Moskovitz J, Wu H, Fives-Taylor PM. Peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) is not a major virulence determinant for the oral pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microbiology.* 2002 Nov;148(Pt 11):3695-703.

Mintz KP. Identification of an extracellular matrix protein adhesin, EmaA, which mediates the adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to collagen. *Microbiology.* 2004 Aug;150(Pt 8):2677-88.

Mosher DF. Physiology of fibronectin. *Annu Rev Med.* 1984;35:561-75.

Narayanan AS, Clagett JA, Page RC. Effect of inflammation on the distribution of collagen types I, III, IV, V and type I trimer and fibronectin in human gingivae. *J Dent Res.* 1985 Sept;64(9):1111-6.

Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006 Sep;56(Pt 9):2135-46.

Ouhara K, Komatsuzawa H, Shiba H, Uchida Y, Kawai T, Sayama K, Hashimoto K, Taubman MA, Kurihara H, Sugai M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* outer membrane protein 100 triggers innate immunity and production of beta-defensin and the 18-kilodalton cationic antimicrobial protein through the fibronectin-integrin pathway in human gingival epithelial cells. *Infect Immun*. 2006 Sep;74(9):5211-20.

Perez BA, Planet BJ, Kachlany SC, Tomich M, Fine DH, Figursky DH. Genetic analysis of the requirement for *flp-2*, *tadV*, and *rcpB* in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm formation. *J Bacteriol*. 2006;188(17):6361-75.

Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):715-27.

Ramasubbu N, Thomas LM, Rangunath C, Kaplan JB. Structural analysis of dispersin B, a biofilm-releasing glycoside hydrolase from the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol Biol*. 2005 Jun 10;349(3):475-86.

Rose JE, Meyer DH, Fives-Taylor PM. Aae, an autotransporter involved in adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. *Infect Immun*. 2003 May; 71(5):2384-93.

Rosenberg M. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing Math FEMS *Microbiol Lett*. 2006 Sep;262(2):129-34.

Ruiz T, Lenox C, Radermacher M, Mintz KP. Novel surface structures are associated with the adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to collagen. *Infect Immun*. 2006 Nov;74(11):6163-70.

Sakurai K, Wang D, Suzuki J, Umeda M, Nagasawa T, Izumi Y, Ishikawa I, Isobe M. High incidence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection in acute coronary syndrome. *Int Heart J*. 2007 Nov;48(6):663-75.

- Shao H, Lamont RJ, Demuth DR. Autoinducer 2 is required of biofilm growth of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*. 2007;75(9):4211-18.
- Socransky SS, Haffajee AD. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. *Periodontal Res*. 1991 May;26(3 Pt 2):195-212.
- Tang G, Kitten T, Munro CL, Wellman GC, Mintz KP. EmaA, a potential virulence determinant of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in infective endocarditis. *Infect Immun*. 2008 Jun;76(6):2316-24.
- Tang G, Ruiz T, Barrantes-Reynolds R, Mintz KP. Molecular heterogeneity of EmaA, an oligomeric autotransporter adhesin of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *Microbiology*. 2007;153:2447-57.
- Timpl R. Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol*. 1996 Oct;8(5):618-24.
- Tomich M, Planet PJ, Figurski DH. The tad locus: postcards from the widespread colonization island. *Nat Rev Microbiol*. 2007 May;5(5):363-75.
- Wang Y, Chen C. Mutation analysis of the flp operon in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Gene*. 2005;351:61-71.
- Wang Y, Liu A, Chen C. Genetic basis for conversion of rough-to-smooth colony morphology in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*. 2005;73:3749-53.
- Weber M. Basement membrane proteins. *Kidney Int*. 1992;41:620-8.
- Wells TJ, Tree JJ, Ulett GC, Schembri MA. Autotransporter proteins: novel targets at the bacterial cell surface. *FEMS Microbiol Lett*. 2007 Sep;274(2):163-72.
- Wilson M, Henderson B. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* relevant to the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *FEMS Microbiol Rev*. 1995 Dec;17(4):365-79.
- Winkler JR, John SR, Kramer RH, Hoover CI, Murray PA. Attachment of oral bacteria to a basement-membrane-like matrix and to purified matrix proteins. *Infect Immun*. 1987 Nov;55(11):2721-6.

Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Grinberg EP. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. J Bacteriol. 2004;186(6):1838-50.

Yu C, Ruiz T, Lenox C, Mintz KP. Functional mapping of an oligomeric autotransporter adhesin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. J Bacteriol. 2008 May;190(9):3098-109.

Yue G, Kaplan JB, Fine DH. A motif in *aae* mediates binding to BECS and endothelium. 87th General Session and Exhibition of the IADR; 2009 Apr; Miami: Miami Beach Convention Center; 2009. Abst 1683.

Yue G, Kaplan JB, Furgang D, Mansfield KG, Fine DH. A second *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* autotransporter adhesin exhibits specificity for buccal epithelial cells in humans and Old World primates. Infect Immun. 2007 Sep;75(9):4440-8.

Zambon JJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J Clin Periodontol. 1985 Jan;12(1):1-20.

Zambon JJ, Slots J, Genco RJ. Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. Infect Immun. 1983 Jul;41(1):19-27.