

JOSELY EMIKO UMEDA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA APÓS A INTERAÇÃO
ENTRE *AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS*
E CÉLULA EPITELIAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

**SÃO PAULO
2010**

RESUMO

UMEDA, J. E. Análise da expressão gênica após a interação entre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e célula epitelial. 2010. 125 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans, associado à etiologia da periodontite agressiva localizada, apresenta vários fatores de virulência, destacando-se a adesão e invasão às células epiteliais, e produção de leucotoxina e toxina distensora citoletal. Durante a infecção, bactérias patogênicas induzem a ativação ou inibição das vias de sinalização do hospedeiro, além de alterarem a expressão de genes bacterianos, visando a sua sobrevivência aos desafios oferecidos pelo novo ambiente. **Objetivos:** Visando contribuir no entendimento da interação entre *A. actinomycetemcomitans* e o hospedeiro, o objetivo do presente estudo foi determinar a transcrição de genes bacterianos relacionados à virulência e a resposta da célula eucarionte após a interação entre *A. actinomycetemcomitans* e células epiteliais gengivais imortalizadas OBA-9.

Métodos: cepas de referência de *A. actinomycetemcomitans* JP2 (sorotipo b), SUNY 465 (sorotipo b), e ATCC 29523 (sorotipo a), foram co-cultivadas com células epiteliais gengivais OBA-09 por períodos de 2 e 24 horas. A transcrição relativa dos genes *omp100 (apiA)*, *aae*, *ltx*, *flp*, *apaH*, *omp29*, *vppA*, *cdtB*, *vapA*, *orf 859*, *cagE*, *emaA* e *pgA* de *A. actinomycetemcomitans* foi determinada, por RT-qPCR. A transcrição de 84 genes associados à via de transdução de sinais em células epiteliais foi analisada por Arranjos RT-qPCR após 24 horas de co-cultura com a amostra *A. actinomycetemcomitans* JP2. Como controles foram utilizadas as cepas bacterianas ou células gengivais isoladamente. A concentração dos mediadores inflamatórios GM-CSF, TNF- α e ICAM-1, cuja expressão gênica foi regulada positivamente após interação com a bactéria foi determinada por ELISA no sobrenadante das células epiteliais gengivais infectadas e em amostras de tecido gengival de indivíduos com periodonto saudável ($n=12$), de pacientes com periodontite agressiva ($n=10$) e com periodontite crônica ($n=11$). **Resultados:** Foram observadas diferenças na expressão dos genes de virulência entre as amostras ATCC29523, SUNY 465 e JP2 no controle e após 2 e 24 horas de infecção. Na condição controle em 2 horas, a amostra JP2 apresentou níveis mais elevados de transcritos dos genes *apaH*, *ltx*, *cdtB*, *vppA* e *omp29* do que as amostras SUNY 465 e ATCC29523. No entanto, após 24 h de interação com célula epitelial, a amostra ATCC29523 mostrou regulação positiva dos genes *aae*, *apaH*, *flp*, apresentando o maior nível de transcrição dos genes codificando proteínas de adesão. A interação com células epiteliais

após 24 h induziu a transcrição de *ltx* a níveis similares pelas amostras consideradas produtoras de níveis baixos (SUNY465) e altos de leucotoxina (JP2), ambas do sorotipo b, enquanto a transcrição de *ltx* pela amostra (sorotipo **a**) manteve-se em baixos níveis. Os genes *omp29* e *cagE* foram transcritos apenas nas amostras JP2 e SUNY465 (sorotipo b), sendo estes valores superiores para a cepa JP2. O gene *pgA* foi regulado positivamente após 2 e 24 h de interação com célula epitelial em todas as amostras testadas. Entre 84 genes testados, quinze foram regulados positivamente nas células OBA-09 após interação com *A. actinomycetemcomitans* ($p<0,01$). Os genes *csf2*, *tnf- α* , *egr-1* e *icam-1* foram transcritos 170; 28,93; 14,08 e 7,67 vezes mais após a infecção em relação ao controle. A análise dos mediadores inflamatórios GM-CSF, TNF- α e ICAM-1 confirmou que estas citocinas são expressas por células epiteliais gengivais infectadas e apresentam-se em concentrações estatisticamente superiores nos tecidos gengivais de pacientes com periodontite em relação aos indivíduos saudáveis, embora não tenham sido observadas diferenças entre periodontite agressiva e crônica. **Conclusões:** A maior transcrição de genes associados à virulência como *omp29* e *ltx* pelas amostras *A.actinomycetemcomitans* sorotipo **b**, justificam a maior virulência. A regulação positiva de *ltx* após contato com célula por 24 h na amostra SUNY 465 sugere que amostras sorotipo **b** não pertencentes ao clone JP2 poderiam expressar, *in vivo*, níveis de leucotoxina similares aos do clone JP2, justificando sua alta prevalência na periodontite agressiva. Por outro lado, a interação de *A. actinomycetemcomitans* sorotipo **a** com células epiteliais induziu a transcrição de genes que codificam adesinas como *aae* e *apaH* e do operon *cdt*. A regulação positiva da transcrição de genes de células epiteliais associados às vias de sinalização, como *csf2* e *tnf- α* após a infecção por *A.actinomycetemcomitans*, demonstra que o cenário da periodontite agressiva, caracterizado por infiltrado macrofágico e destruição óssea, pode ter início precocemente durante a infecção, após a interação da bactéria com o epitélio.

Palavras-chave: Doença periodontal. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Fatores de virulência. Citocinas. Inflamação. Expressão gênica.

ABSTRACT

UMEDA, J. E. Gene expression analysis after interaction between *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and epithelial cell. 2010. 125 p. Ph.D. Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans, associated to the etiology of localized aggressive periodontitis, produces several virulence factors, mainly the adhesion and invasion to epithelial cells, and production of leucotoxin and cytolethal distending toxin. During the infection, pathogenic bacteria induce the activation or inhibition of signaling pathways of the host, in addition to altering the bacterial gene expression, favouring to survive the challenges offered by the new environment. **Objective:** Aiming to contribute in the understanding of the interaction between *A. actinomycetemcomitans* and the host, the objective of this study was to determine the transcription of bacterial genes related to the virulence and the response of the eukaryotic cell after the interaction between *A. actinomycetemcomitans* and immortalized gingival epithelial OBA-9 cells. **Methods:** reference strains of *A. actinomycetemcomitans* JP2 (sorotype b), SUNY 465 (sorotype b), and ATCC 29523 (sorotype a), were co-cultured with OBA-9 cells for bacterial gene expression analysis in 2 and 24 hours of infection. The relative transcription of *omp100 (apiA)*, *aae*, *ltx*, *flp*, *apaH*, *omp29*, *vppA*, *cdtB*, *vapA*, *orf 859*, *cagE*, *emaA* and *pgA* genes of *A. actinomycetemcomitans* was determined after adhesion with epithelial cells by RT-qPCR. The profile of transcription of 84 genes related to signaling transduction in epithelial cells were analysed by RT-qPCR Arrays after 24 hours of infection with *A. actinomycetemcomitans* JP2. Isolated bacterial strains or gingival cells were used as control. The concentration of GM-CSF, TNF- α and ICAM-1, that were up-regulated inflammatory mediators after interaction with bacteria, were determined by ELISA in the supernatant of infected gingival epithelial cells and in gingival tissue of patients with aggressive periodontitis (n=10), chronic periodontitis (n=11) and periodontally health subjects (n=12). **Results:** differences were observed in the expression of virulence genes among ATCC29523, SUNY 465 and JP2 strains in control and after 2 and 24 hours of infection. In 2 hours of the control condition, the strain JP2 showed the highest levels of *apaH*, *ltx*, *cdtB*, *vppA* and *omp29* transcript genes than SUNY 465 and ATCC29523. However, after 24 hours of interaction, the ATCC 29523 strain showed up-regulation of *aae*, *apaH*, *flp* genes with highest levels of transcript genes coding adhesion

proteins. In addition, the interaction with epithelial cells after 24 hours reach similar levels of mRNA of *ltx* between minimally leukotoxic strains (SUNY465) and highly leukotoxic (JP2), both serotype **b**, while the **a** serotype maintains lowest levels. The *omp29* and *cagE* genes, were transcribed only by JP2 and SUNY465, and highest levels was showed by JP2. The *pgA* gene was up-regulated after 2 and 24 hours of infection for all analysed strains. In relation the gene expression of gingival epithelial cells OBA-9 after infection with *A. actinomycetemcomitans*, it was demonstrated 15 up-regulated genes compared with control without bacteria ($p<0.01$). The *csf2*, *tnf- α* , *egr-1* and *icam-1* genes were transcribed 170, 28.93, 14.08 and 7.67 fold change more compared with control. The functional analysis of inflammatory mediators GM-CSF, TNF- α and ICAM-1, confirmed that these cytokines are expressed by infected gingival epithelial cells and showed statically highest concentration in the gingival tissues of periodontitis patients in relation to health individuals, although there were not observed differences between diseases aggressive and chronic. **Conclusions:** the highest transcription of genes associated to the virulence, such as *omp29* and *ltx* by *A.actinomycetemcomitans* strains serotype **b**, justifying the highest virulence. The up-regulation of *ltx* gene after contact with cells in 24 hours by SUNY 465 strain, suggest that the presence of serotype **b** non JP2-like would be express, *in vivo*, at similar levels of leucotoxin by the JP2 like, justifying the high prevalence in the aggressive periodontitis. By the other side, the interaction of *A.actinomycetemcomitans* serotype **a** with epithelial cells induced the transcription genes that encoded adhesins, such as *aae*, *apaH* and *cdt* operon. The up-regulation of transcription of genes by epithelial cells associated with signaling transduction as *csf2* and *tnf- α* after infection by *A.actinomycetemcomitans*, it demonstrates that the scenarium of the aggressive periodontitis, characterized with macrophage infiltrate and bone destruction, begins early during the infection, after the interaction of the bacterium with the epithelium.

Key words: Periodontal disease. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Virulence factors. Cytokines. Inflammation. Gene expression.

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória das estruturas do periodonto associada à colonização do sulco subgengival por bactérias anaeróbias Gram-negativas específicas (SLOTS, 1986; MINTZ et al., 2004). Dentre estas bactérias destaca-se *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, denominado anteriormente como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e reclassificado no gênero *Aggregatibacter* juntamente com outras espécies orais como *A. aphrophilus* (anteriormente *Haemophilus aphrophilus*) e *A. paraphrophilus* (anteriormente *Haemophilus paraphrophilus*) (NORSKOV-LAURITSEN e KILIAN, 2006). A *.actinomycetemcomitans* é um cocobacilo, fermentativo, Gram negativo e capnofílico, associado à periodontite agressiva localizada, podendo ser encontrado também em pacientes com periodonto saudável (FIVES-TAYLOR et al., 1999; LI et al., 2004; YANG et al., 2004; WILSON e HENDERSON, 1995; MEYER e FIVES-TAYLOR, 1997; ZAMBON et al., 1985; FAVERI et al., 2009). A forte correlação entre *A. actinomycetemcomitans* e a doença periodontal foi evidenciada em estudos clínicos, microbiológicos e de resposta imune (SLOTS e GENCO, 1984; ZAMBON et al., 1985). *A. actinomycetemcomitans* pode ainda ser associado a infecções extra-orais como endocardite, bacteremia, septicemia, meningite, pneumonia, osteomielite, infecções do trato urinário e abcessos (PATUREL et al., 2004; HENDERSON et al., 2003; PAGE e KING, 1966; MUHLE; RAU; RUSKIN, 1979).

A. actinomycetemcomitans apresenta seis sorotipos: a, b, c, d e, f; sendo o sorotipo b, o mais frequente nos casos de periodontite agressiva e infecções extra-orais como endocardite (SARELA et al., 1992; KAPLAN et al., 2001; PATUREL et al., 2004). *A. actinomycetemcomitans* juntamente com *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Aggregatibacter aphrophilus*, *Aggregatibacter paraphrophilus*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* e *Kingella kingae*, compõem o grupo HACEK, envolvido com a endocardite em humanos (PATUREL et al., 2004; FINE et al., 2006; NORSKOV-LAURITSEN e KILIAN, 2006), sendo que, dentro deste grupo, *A. actinomycetemcomitans* é o mais prevalente nos casos de endocardite (PATUREL et al., 2004).

Os fatores de virulência produzidos por *A. actinomycetemcomitans* favorecem a colonização da bactéria aos tecidos do hospedeiro. Dentre estes fatores, destacam-se mecanismos de adesão e invasão aos tecidos do hospedeiro, liberação de toxinas como a leucotoxina e a toxina distensora citoletal, produção de catalase e proteínas de superfície ligantes ao ferro (WILSON e HENDERSON, 1995; GRABER et al., 1998; MAYER et al., 1999; KOMATSUZAWA et al., 1999; KOMATSUZAWA et al., 2002; MIYAZAKI et al., 1984; KACHLANY et al., 2000; NALBANT et al., 2003; ROSE et al., 2003; MINTZ et al., 2004; OUHARA et al., 2006).

A. actinomycetemcomitans também é capaz de formar biofilmes sobre superfícies abióticas como vidros, plásticos e hidroxiapatita, constituindo-se em importante fator na colonização da cavidade oral e desencadeamento da doença (KAPLAN, 2003). O principal componente da matriz do biofilme formado por esta espécie é o poli-N-acetyl-glicosamina (PGA), codificado pelo lócus *pga ABCD*. O PGA promove adesão intercelular, constitui barreira física e mecânica, e confere à bactéria maior resistência a antibióticos (KAPLAN et al., 2004). Isolados clínicos de *A. actinomycetemcomitans*, apresentam capacidade de formar biofilmes densos sobre superfícies abióticas *in vitro*, resistentes à remoção por agentes como detergentes, proteases, aquecimento e sonicação leve (FINE et al., 1999). Por outro lado, *A. actinomycetemcomitans* também pode sintetizar uma hidrolase solúvel que degrada o PGA, denominada dispersina B (Dsp B). A dispersina B apresenta grande potencial biotecnológico, pois além de promover a dispersão do biofilme de *A. actinomycetemcomitans*, esta provoca a desagregação e dispersão do biofilme produzido por diversas outras bactérias Gram positivas e negativas (RAMASUBBU et al., 2005).

Em *A. actinomycetemcomitans*, a aderência não específica e autoagregação relacionam-se com a presença de fímbrias (KACHLANY et al., 2000). O lócus de aderência “tight” (*tad*) de *A. actinomycetemcomitans* está associado à formação e maturação da fímbria FLP, requerida para formação de biofilmes densos (PEREZ et al., 2006). É composto por 14 genes dispostos em um operon: *flp1-flp2-tadV-rcpCAB-tadZABCDEFG* (Figura1) (KACHLANY et al. 2000; TOMICH; FINE; FIGURSKI, 2006). O gene *flp1* codifica a proteína pré-FLP1, principal componente estrutural da fímbria FLP, que após modificações proteolíticas promovidas por outros genes do operon *tad*, forma o pili FLP funcional (HAASE; ZMUDA; SCANNAPIECO, 1999;

KACHLANY et al., 2001; TOMICH; FINE; FIGURSKI, 2006, KAPLAN et al., 2002; PEREZ et al., 2006). O segundo gene do operon, *flp2*, codifica possivelmente a subunidade secundária da fímbria (PEREZ et al., 2006) apresentando 50% de similaridade com a proteína Flp1 (KACHLANY et al., 2001). O produto do gene *tadV* é uma peptidase pré-pilina do sistema Tad de *A. actinomycetemcomitans* com secreção tipo II, homólogo à proteína *cpa* de *Caulobacter crescentus* (SKERKER et al., 2000), requerido para a formação e maturação do pili Flp1 (TOMICH; FINE; FIGURSKI, 2006).

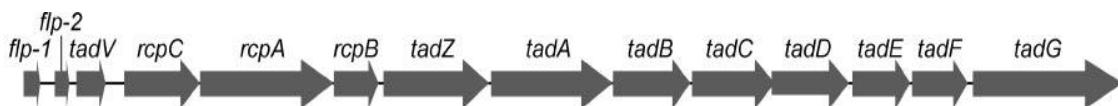


Figura 1- Lócus tad de *A. actinomycetemcomitans*

FONTE: Adaptado de Tomich, Fine e Figurski (2006).

A expressão das fímbrias pelas células de *A. actinomycetemcomitans* exibe fases de transição que podem ser influenciadas por fatores ambientais como pH, temperatura, oxigênio e concentração de ferro (SCANNAPIECO et al., 1987). Esta fase de transição na expressão da fímbria se reflete na capacidade de *A. actinomycetemcomitans* formar duas variantes morfológicas de colônias, *in vitro* (HAASE; ZMUDA; SCANNAPIECO, 1999): colônias com fenótipo rugoso, caracterizadas por serem translúcidas (~1mm) com bordas irregulares e superfície aderente; e colônias com fenótipo liso caracterizadas por serem maiores, com bordas regulares, centro com forma de estrela e mais opacas obtidas após repetidas passagens em meio de cultura. Isolados clínicos de morfologia colonial rugosa aderem firmemente às superfícies com formação de biofilmes densos enquanto a variante lisa não expressa fímbria e apresenta capacidade de autoagregação reduzida (FINE et al., 1999). A transição do fenótipo rugoso para liso pode estar associada a um evento mutacional com deleção ou substituição de um nucleotídeo na região -35 ou -10 do promotor *flp* (KARCHED; SATYASEELA; AISIKAINEN, 2007; WANG; LIU; CHEN, 2005).

Dois outros genes, *rcpA* e *rcpB*, que compõem o lócus *tad*, codificam as proteínas de membrana externa RcpA e RcpB respectivamente, expressas exclusivamente nas variantes rugosas e envolvidas na adesão inicial, colonização às superfícies mucosas e adesão à hidroxiapatita recoberta por saliva (HAASE; ZMUDA; SCANNAPIECO, 1999). À jusante dos

genes *rcp*, encontramos o gene *tadA*, cuja proteína codificada é homóloga à secreção de NTPases da secreção tipo IV (TOMICH; FINE; FIGURSKI, 2006). Mutantes deficientes nos genes *tadA* e *fip1* mostraram capacidade reduzida de colonização na cavidade oral de ratos (SHEINE et al., 2003).

A adesão de *A. actinomycetemcomitans* ao tecido epitelial é mediada por macromoléculas como adesinas fimbriais e não fimbriais (MINTZ e FIVES-TAYLOR, 1994), e receptores específicos na superfície da célula hospedeira, como transferrinas e integrinas (HENDERSON et al., 2003). A ligação de *A. actinomycetemcomitans* ao receptor da célula hospedeira provoca um evento de sinalização, levando à formação de microvilosidades devido ao rearranjo do citoesqueleto da célula hospedeira, resultando na internalização da bactéria via vacúolo endocítico. As variantes lisas expressam proteínas associadas à maior eficiência de invasão às células epiteliais do que as rugosas (HAASE; STREAM; SCANNAPIECO, 2003). *A. actinomycetemcomitans* apresenta recursos que possibilitam escapar do vacúolo através da liberação da enzima fosfolipase C (HENDERSON et al., 2003) e uma vez livre no citoplasma, *A. actinomycetemcomitans* estimula a regulação de uma série de genes que facilitam sua adaptação ao ambiente intracelular, permitindo desta maneira, a sua multiplicação e difusão intra e intercelularmente (HANDFIELD et al., 2005)

O envolvimento de genes de *A. actinomycetemcomitans* que participam no processo de adesão e invasão às células epiteliais não foi completamente elucidado. Entre as adesinas não-fimbriais, as proteínas do envelope externo de bactérias (OMPs) que foram altamente conservadas ao longo da evolução, exercem funções como adesinas, invasinas, além de outras funções como receptores para bacteriófagos, atividade de porinas, mediadores da conjugação, fator de resistência ao soro, além de conferirem estabilidade à membrana externa (ASAKAWA et al., 2003). Diferentes OMPs de *A. actinomycetemcomitans* revelaram similaridade a fatores de virulência encontrados em outros microrganismos patogênicos. O soro de pacientes com periodontite relacionada a *A. actinomycetemcomitans* apresentou anticorpos específicos contra as seis maiores proteínas de membrana externa: OMP100, OMP64, OMP39, OMP29, OMP16 e OMP18 (KOMATSUZAWA et al., 1999). A OMP100, uma proteína de 100kDa, também conhecida como ApiA, contribui na adesão e invasão de *A. actinomycetemcomitans* em células de carcinoma oral (KB) (ASAKAWA et al., 2003), além de conferir ligação à fibronectina e ao

colágeno (YUE et al., 2007). A OMP29, pertencente à família OmpA, é uma proteína termomodificável, que representa o principal alvo de imunoglobulinas G (IgG) no soro de pacientes com periodontite colonizados por *A. actinomycetemcomitans* (WILSON, 1991a e b). As OmpA representam a principal proteína do envelope externo de muitos patógenos Gram negativos, e relacionam-se à capacidade de invasão em células não fagocíticas. É interessante observar que a resposta contra OMP100 e OMP29 pode ser observada na maioria dos casos de periodontite agressiva, mas muitos pacientes que apresentam anticorpos séricos contra LPS de *A. actinomycetemcomitans* são soronegativos para estas OMPs (BRUNHEIRA, 2006), sugerindo expressão diferencial de OMP29 entre as amostras. Estudo recente em nosso laboratório mostrou que a expressão do gene *omp29* é dependente da fase da cultura bacteriana, indicando regulação da expressão deste fator de virulência por condições ambientais (LONGO, 2008).

Outras proteínas de membrana externa, consideradas adesinas foram relatadas em *A. actinomycetemcomitans*. A proteína autotransportada Aae (sistema de transporte do tipo V), também está envolvida com a adesão (ROSE; MEYER; FIVES-TAYLOR, 2003; FINE et al., 2006). Uma mutante de *A. actinomycetemcomitans* deficiente em *aae* mostrou reduzida ligação às células epiteliais (ROSE; MEYER; FIVES-TAYLOR, 2003). A interação entre a dupla mutante *A. actinomycetemcomitans aae⁻ apiA⁻*, (que codifica a OMP100) e célula epitelial humana confirmou que Aae e ApiA são requeridos para conferir uma ligação eficiente, porém estas adesinas não foram relevantes na interação com células epiteliais bovinas ou de ratos (YUE et al., 2007).

O gene *emaA*, homólogo às proteínas ligantes de colágeno YadA de *Yersinia enterocolitica*, codifica um mediador direto de adesão ao colágeno (MINTZ et al., 2004), mas esta interação não é exclusiva desta adesina, pois os produtos dos genes *apiA* e *apiBC* também participam na interação de *A. actinomycetemcomitans* a proteínas da matriz extracelular, incluindo vários tipos de colágeno, fibronectina, laminina e glicosaminoglicanas (LI et al., 2004).

Pouco se conhece sobre os genes associados à capacidade de invasão de *A. actinomycetemcomitans* em células não fagocíticas. Foi sugerido que o gene *apaH* de *A. actinomycetemcomitans*, homólogo a *ialA*, *ygd*, e *invA*, associados com a invasão de *Bartonella bacilliformis* (MITCHELL e MINNICK, 1995), *Escherichia coli K1* (BESSMAN et al., 2001) e *Rickettsia prowazekii* (GAYWEE et al., 2002) respectivamente, relaciona-se com a capacidade

invasiva também em *A. actinomycetemcomitans*. Mutantes defectivas em *apaH* perderam a capacidade invasiva, enquanto a presença de um plasmídio recombinante codificando *A. actinomycetemcomitans apaH* conferiu invasividade a *E. coli* (SAARELA et al., 1999). Este gene codifica uma diadenosina hidrolase que cliva uma “alarmôna” diadenosina tetrafosfato (Ap4A), uma classe de nucleotídeos sinalizadores do tempo de divisão celular (ROSE et al., 2003; SAARELA et al., 1999). As cepas de *A. actinomycetemcomitans* podem ser divididas em cinco grupos com relação ao gene *apaH* (DOGAN et al., 1999), e a maioria das amostras apresenta ApaH contendo a seqüência de aminoácidos RGD que reconhece receptores integrina na superfície de células eucariontes (SAARELA et al., 1998; PAJU et al., 1998; PINHEIRO et al., 2010).

A invasão de *A. actinomycetemcomitans* em célula epitelial requer também a expressão de proteínas relacionadas à adaptação intracelular e homeostase. As proteínas codificadas pela *orf 859* e *vapA* foram associadas à adaptação intracelular. Mutantes defectivos em *orf859* apresentaram deficiência na sobrevivência intracelular enquanto o produto do gene *vapA*, foi relacionado ao aumento da capacidade invasiva. No entanto, o produto destes genes ainda não tem um papel definido na virulência de *A. actinomycetemcomitans* (HANDFIELD et al., 2005; CAO et al., 2004).

A. actinomycetemcomitans apresenta também a capacidade de expressar duas toxinas com propriedades citolíticas contra as células humanas, a toxina distensora citoletal e a leucotoxina. A toxina distensora citoletal (CDT) é uma holotoxina constituída por três subunidades CdtA, CdtB e CdtC (NALBANT et al., 2003), codificados pelos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* (MAYER et al., 1999). Esta toxina é associada a indução da proteína p21^{CIP1/WAF1} (regulador negativo de quinases ciclinas dependentes-cdk) levando à parada do ciclo celular na fase G2 em diferentes células alvo humanas (SATO et al., 2002), indução de apoptose relacionada à expressão da proteína p53 (SATO et al., 2002; HANDFIELD et al., 2005; AMARAL et al., 2010), imunossupressão de linfócitos T (MAYER et al., 1999; SHENKER et al., 1999; SUGAI et al., 1998), estimulação da secreção de citocinas (AKIFUSA et al., 2005), e inibição da produção de NO por macrófagos ativados (FERNANDES et al., 2008). CdtB representa a subunidade tóxica que exibe atividade de fosfatase e desoxirribonuclease 1, enquanto as subunidades CdtA e CdtC promovem a ligação e transporte de CdtB à célula hospedeira (SMITH

et al., 2006). Além disso, CDT também está envolvida no processo de reabsorção óssea, através da indução da expressão de RANKL por células do tecido periodontal, induzindo assim, a ativação e diferenciação de osteoclastos (BELIBASAKIS et al., 2005; BELIBASAKIS et al., 2005b).

Um estudo recente sobre avaliação de títulos de imunoglobulinas G para cada sub-unidade CDT demonstrou que as frações CDT são pouco imunogênicas, embora tenha sido demonstrado que a resposta a CdtC ocorre apenas no soro de pacientes com periodontite agressiva generalizada, mas não localizada, enquanto a resposta às demais frações não se relacionou com a condição periodontal (ANDO et al., 2010).

A outra toxina secretada por *A. actinomycetemcomitans* é a leucotoxina, codificada em um operon composto por quatro genes, *ltxC*, *ltxA*, *ltxB*, *ltxD*, capaz de provocar a morte de leucócitos polimorfonucleares humanos, macrófagos (KOLODRUBETZ et al., 1989) e células HL-60 promielocíticas (NALBANT et al., 2003) por apoptose. A leucotoxina é expressa de maneira diferencial entre as amostras de *A. actinomycetemcomitans* (LALLY et al., 1989), sendo que as amostras produtoras de altos níveis da toxina apresentam deleção de 530pb na região promotora do operon *ltx*, resultando num aumento da transcrição da leucotoxina. Em estudo longitudinal com 24 crianças de famílias com histórico de periodontite agressiva, foi demonstrado que as crianças que abrigavam o genótipo de *A. actinomycetemcomitans* associado à maior produção de leucotoxina (*JP2-like*) apresentavam maior possibilidade de conversão de saúde para doença agressiva do que as demais (BUENO; MAYER; DI RIENZO, 1998). Foi descrito também maior expressão da leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* em uma cepa causada pela inserção de IS 1301, rompendo a regulação normal do operon *ltx* (MITCHELL; GAO; DEMUTH, 2003).

O envolvimento dos genes *cdt* e *ltx* de *A. actinomycetemcomitans* na capacidade de induzir apoptose em células T, foi demonstrado em estudos com mutantes isogênicos em *ltxA* ou em cada gene *cdt*. No entanto, outras moléculas com função citolítica além de CDT ou LTX, como as proteínas Groel-*like* também participam do processo apoptótico (NALBANT et al., 2003).

A expressão de genes de virulência por bactérias patogênicas é geralmente modulada em resposta a mudanças ambientais encontradas no sítio de infecção. A análise de fatores associados à virulência de um dado patógeno apenas em condições de laboratório, poderia implicar na ausência de expressão de muitos destes fatores durante o crescimento *in vitro* (HANDFIELD et al., 2000). Assim, no presente estudo, nos propomos a analisar a transcrição de fatores associados a virulência da bactéria após a sua interação com células epiteliais gengivais.

Não somente a expressão dos genes de *A. actinomycetemcomitans* poderia ser alterada durante a infecção, como também a expressão de uma série de genes das células eucarióticas pode ser induzida.

A manutenção do organismo livre de patógenos invadindo os tecidos requer a cooperação entre o sistema immune inato e adaptativo. A interação da bactéria com células epiteliais desencadeia as primeiras reações do hospedeiro frente aos microrganismos. A resposta inicial à infecção é responsabilidade do sistema imune inato, que reconhece os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por diferentes receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), resultando na ativação de uma série de vias de sinalização. Entre os PRRs incluem-se os receptores Toll - *like* (TLRs), receptores com domínio de ligação de nucleotídeos e oligomerização (NOD)-*like* (NLRs) e outros (FRANCHI et al., 2009). Os receptores Toll-like são proteínas transmembrana, enquanto os receptores NOD são sensores citosólicos intracelulares, descritos inicialmente como “receptores Toll-like intracelulares” que reconhecem PAMPs associados a patógenos intracelulares (INOHARA et al., 1999; KIRKWOOD et al., 2009; FRANCHI et al., 2009).

A ligação dos PAMPs aos TLRs é suficiente para a transcrição, síntese e secreção de citocinas como IL-8, IFN- γ e IL-12 (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002; TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003), mas não de citocinas como IL-1 β e IL-18, cuja produção e secreção são extremamente controladas, requerendo um segundo sinal distinto (ABDUL SATER et al., 2009). Neste último caso, a ligação de um PAMP como o lipopolissacarídeo (LPS) ou a flagelina, estimula o TLR expresso na superfície celular e promove a produção e o acúmulo intracelular destas citocinas imaturas. Um segundo sinal, usualmente derivado de sinais de perigo (DSs), produzido pela célula infectada, morrendo ou sob condição de estresse, conhecido como padrões moleculares associados a dano (DAMPs), é reconhecido pelas células vizinhas. O DS liga-se ao

receptor de sinal de perigo (DSR) estimulando a formação de um inflamassoma que ativa a protease caspase-1 e resulta no processamento e na secreção das citocinas (BRODSKY e MONAK, 2009; ABDUL-SATER et al., 2009).

Os patógenos que ganham acesso ao compartimento celular, como no citosol, são reconhecidos pelos receptores NOD. A infecção de células epiteliais por bactérias invasivas, como *Shigella flexneri* invasiva provoca indução da oligomerização de NOD1, levando à ativação da via NFkB (CHAMAILLARD et al., 2003).

A transdução de sinais é um processo complexo em que a célula converte os sinais ambientais em uma série de reações bioquímicas intracelulares (PENG et al., 2010). Assim, após a sinalização provocada por diferentes estímulos, ocorre a ativação de vias de sinalização, e a ativação da mesma via pode ter consequências distintas, na dependência do estímulo inicial. Além disso, cada tipo de célula parece predisposta a responder a ativação de uma via particular de sinalização com uma consequência distinta (IQBAL et al., 2010).

A via da proteínas quinase mitógeno ativadas (MAPK) é considerada elemento chave na detecção e transmissão da resposta celular pela ação sequencial de eventos de fosforilação frente às condições ambientais. Esta via constitui uma grande rede de quinases intracelulares que regula diversos processos fisiológicos, como crescimento celular, diferenciação e morte celular por apoptose (JUNTILLA; LI; WESTERMACK, 2008). As MAPKs são famílias de proteínas cuja atividade é regulada pela fosforilação de resíduos treonina (T) e tirosina (Y) conservados. A estimulação por fatores de crescimento, citocinas inflamatórias ou estresse físicos, leva à ativação de MAPKs. A cascata de sinalização MAPK é modulada por três eventos subsequentes de fosforilação (PIMENTA e PASCUAL, 2007) (Figura 2). Isto significa que cada MAPK é fosforilada por MKKs (Serina/Treonina (S/T) e Tirosina (Y)), que por sua vez é ativada por S/T MKKK quinases (JUNTILLA; LI; WESTERMACK, 2008).

Três vias de MAPKs têm sido caracterizadas em detalhe (Figura 2): quinase 1,2 regulada extracelularmente (ERK1,2), quinase c-JUN NH₂-terminal (JNK) e p38. A via ERK é ativada por uma variedade de mitógenos e forbol éster, enquanto a via c-JUN NH₂-terminal quinase (JNK)/proteína quinase stress ativada (SAPK) e a via p38 são estimuladas principalmente por stress ambiental e citocinas inflamatórias. Após a ativação das MAPKs (ERK 1,2, JNK 1-3 e p38 $\alpha, \beta, \gamma, \delta$) no citoplasma ou núcleo, estas regulam a transcrição gênica, modulando a função do fator de transcrição alvo através da fosforilação serina/treonina (S/T). Em adição ao efeito

transcricional da sinalização das MAPKs, evidências apontam que MAPKs regulam o comportamento celular, fosforilando proteínas citoplasmáticas alvo, como as proteínas apoptóticas (ex. famílias BH3) ou proteínas do citoesqueleto (JUNTILLA; LI; WESTERMACK, 2008).

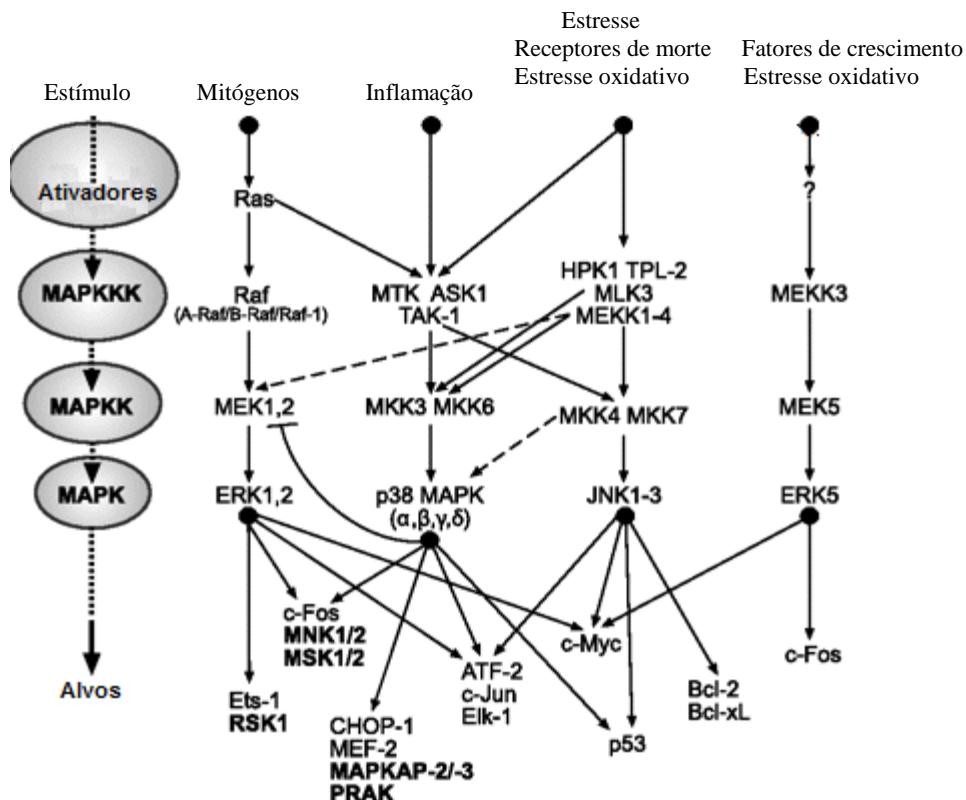


Figura 2- Vias de sinalização MAPK. As vias de sinalização MAPK estão organizadas em módulos de cascatas em que a ativação por receptores da superfície celular das quinases antecedentes levam à ativação sequencial de um módulo MAPK (MAPKKK → MAPKK → MAPK). O esquema ilustra os componentes da via principal MAPK e exemplos das proteínas alvo da via MAPK. As quinases alvo estão em negrito. As linhas indicam as conexões de sinalização contexto-dependente entre os módulos MAPK.

Fonte: Adaptado de Juntilla, Li e Westermack (2008)

A via p38 MAPK (MAPKKKs/MKK3,4,6/p38 $\alpha, \beta, \gamma, \delta$) pode ser ativada em resposta a citocinas inflamatórias, assim como a patógenos e estresse ambiental (estresse osmótico, luz ultravioleta, choque térmico e hipóxia). Esta via também pode ser ativada por alguns mitógenos, incluindo eritropoetina, fator 1 de estimulação de colônias (M-CSF) e fator 2 de estimulação de

granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (JUNTILLA; LI; WESTERMACK, 2008). Considerando a diversidade de sinais que ativa a via p38 MAPK, não é surpresa que diversos MAPKKks possam iniciar o módulo de sinalização p38 MAPK e que a especificidade de ativação pode ser determinada pelo estímulo. A proteína p38 é representada por 4 isoformas: p38 α , p38 β , p38 γ , e p38 δ . A ativação de todas as isoformas de p38 é alcançada pela dupla fosforilação de uma treonina e uma tirosina dentro da sequência treonina-glicina-tirosina (TGY) no domínio de ativação da quinase (JUNTILLA; LI; WESTERMACK, 2008). A proteína p38 fosforilada pode ativar vários fatores de transcrição, incluindo ATF-2, CHOP-1, MEF-2, p53, e Elk-1. Além disso, p38 pode ativar outras quinases, como MNK1 and MNK2, MSK1, PRAK, MAPKAPK-2, and MAPKAPK-3. Entre as isoformas, a proteína p38 α tem sido alvo de mais estudos e é provavelmente a mais relevante na resposta inflamatória (MUTHUSAMY e PIVA, 2010). A ativação da via p38 MAPK é requerida para indução de apoptose em diferentes células, parada do ciclo celular na fase G2/M e regulação do ciclo celular através da modulação das proteínas p53 e p73. A via p38 apresenta ainda, outras importantes funções, como regulação de moléculas inflamatórias, diferenciação de queratinócitos, células epidermais, mioblastos e células do sistema imune, assim como media a resposta imune inata (JUNTILLA; LI; WESTERMACK, 2008). Além disso, a ativação da via p38 MAPK também está associada ao início da doença periodontal (KIRKWOOD e ROSSA, 2009).

A via JNK (quinase c-JUN N-terminal) é ativada principalmente por estresse celular e citocinas (JUNTILLA; LI; WESTERMACK, 2008). As quinases JUN N-terminal apresentam-se em três isoformas: JNK1, JNK2 e JNK3. As JNKs são ativadas por MKK4 e MKK7. Estas MAPKKs são ativadas por MAPKK-quinases (MAPKKK) como MEK1, MEKK2, e por uma variedade de outros estímulos dependendo do tipo celular (MUTHUSAMY e PIVA, 2010). A via JNK pode mediar apoptose, proliferação, ou sobrevivência, dependendo do estímulo e condições celulares (JUNTILLA; LI; WESTERMACK, 2008). O mais clássico substrato de JNK é o fator de transcrição c-Jun, do qual o nome JNK é derivado. JNK pode ativar outros fatores de transcrição, como ATF-2, Elk-1, MEF-2c, p53, and c-Myc. JNK também apresenta outros substratos transcripcionais, como as proteínas antiapoptóticas Bcl2 e Bcl-xL (JUNTILLA; LI; WESTERMACK, 2008).

A via ERK (A-Raf, B-Raf, Raf-1 \rightarrow MEK1,2 \rightarrow ERK1,2) é ativada principalmente em resposta a mitógenos e fatores de crescimento. Muitos dos sinais ativadores da via ERK são

iniciados através da ativação de pequenas proteínas G, Ras, proteínas ligadas à membrana ativadas através da troca de ligação GDP para GTP. Esta via têm sido associada com crescimento celular, proliferação celular e sobrevivência (JUNTILLA; LI; WESTERMACK, 2008). As proteínas quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK) apresentam-se em diferentes isoformas: ERK1/2, ERK3/4, ERK5 e ERK7/8. Entre as isoformas identificadas, a ERK1/2 é a melhor caracterizada, e envolve vários estímulos e receptores que ativam MAPKKK (Raf-1, B-Raf, A-Raf). O MAPKKK ativado desencadeia a fosforilação de MEK1 e MEK2 (MAPKK), que por sua vez, fosforila ERK1/2. O ERK1/2 fosforilado ativa os alvos subsequentes como Elk1, c-Fos e c-Myc (MUTHUSAMY e PIVA, 2010). A sinalização mediada por ERK1/2 tem o papel fundamental na proliferação celular e sobrevivência (JUNTILLA; LI; WESTERMACK, 2008).

Sinais inflamatórios, estresse metabólico e dano ao DNA ativam também a via NFkB, fundamental na regulação da inflamação, resposta imune inata e adaptativa, desenvolvimento, sobrevivência e proliferação celular (O'DEA e HOFFMANN, 2009). A família de fatores de transcrição NFkB forma complexos diméricos com famílias das proteínas Rel, que consistem em cinco membros: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NFkB1) e p52/p100 (NFkB2). O complexo inativo NFkB/Rel está localizado no citoplasma ligado a proteínas inibitórias kB (IkB). Para que ocorra a ativação do complexo NFkB/Rel, a proteína IkB necessita ser fosforilada por quinases IkB (IKK) que são por sua vez, ativados por citocinas, fatores de crescimento, receptores de抗ígenos, MAPKKKs e outras quinases. Uma vez que o complexo NFkB/Rel esteja livre de proteínas IkB, este pode translocar-se para o núcleo e assim induzir a transcrição dos genes alvos, sendo este processo conhecido como via canônica. O complexo NFkB/Rel pode também sinalizar através de uma via não canônica (MUTHUSAMY e PIVA, 2010). Enquanto a ativação da via p38 MAPK foi associada ao início da doença periodontal (KIRKWOOD e ROSSA, 2009), a ativação da via do NFkB foi associada ao aumento da severidade da doença periodontal (AMBILI et al., 2005).

Portanto, o epitélio gengival não representa apenas uma barreira física contra a invasão de patógenos, mas também pode atuar como sensor em resposta à presença das bactérias através dos receptores de reconhecimento de patógenos (PRR), como os receptores Toll-like (TLRs) e receptores NOD (NLRs) (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002; INOHARA et al., 1999). Além disso, pelo menos um dos receptores de sinal de perigo, o receptor purinérgico para ATP

extracelular (P2X7) também é expresso e funcional em células epiteliais gengivais (YILMAZ et al., 2010). Foi também demonstrado que as células do epitélio gengival, bem como outras células do epitélio oral expressam inflamassoma Nalp3, que quando ativado resulta na secreção de IL-1 β (YILMAZ et al., 2010). As células epiteliais gengivais (GEC) mostram-se assim, fundamentais na resposta inata do hospedeiro frente às bactérias periodontais (DARVEAU; TANNER; PAGE, 1997; ESKAN et al., 2008; HASEGAWA et al., 2008; YILMAZ et al., 2010).

A maioria dos estudos sobre a resposta imune inata contra infecções bacterianas têm-se centrado em células do sistema imune de origem hematopoietica, mas as células epiteliais infectadas por *A.actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* e outras bactérias orais também podem induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, defensinas e moléculas de adesão intercelular (DARVEAU; TANNER; PAGE, 1997; KRISANAPRAKORNKIT et al., 2000; SANDRO et al., 2000; ASAII et al., 2001; SCANNAPIECO; WANG; SHIAU, 2001, HUANG et al., 2004; KUSUMOTO et al., 2004; EICK et al., 2006; HASEGAWA et al., 2008; SHIMADA et al., 2008; ESKAN et al., 2008).

Estudos prévios demonstraram que o contato de células epiteliais com produtos de *A. actinomycetemcomitans* é capaz de modular a expressão gênica da célula epitelial. Por exemplo, os níveis de prostaglandina-2 (PGE2), importante mediador da resposta inflamatória e de cicloxigenase-2, foram estimulados pelo contato de *A. actinomycetemcomitans* com células epiteliais gengivais (HGEC) (NOGUSHI et al., 2003).

Proteínas de membrana externa de *A. actinomycetemcomitans*, como OMP100, induzem a secreção de citocinas inflamatórias e peptídeos antimicrobianos em células epiteliais gengivais. A OMP100 de *A. actinomycetemcomitans* é capaz de ligar-se à fibronectina e esta interação induz a síntese de β -defensina2 humana (hBD2) via MAP kinase, embora a estimulação secundária por citocinas inflamatórias induzidas pela exposição bacteriana possivelmente colabora no processo (OUHARA et al., 2006).

A interação entre células epiteliais e microrganismos é o passo inicial da infecção bacteriana no periodonto. Assim, o conhecimento dos mecanismos induzidos em cada etapa da interação entre bactéria e células epiteliais poderia corroborar para o entendimento da patogenia, bem como fornecer bases científicas para o desenvolvimento de estratégias que dificultem a colonização pelo patógeno.

Grande parte das pesquisas atualmente tem contribuído na elucidação dos mecanismos pelos quais as células de organismos multicelulares e unicelulares “sentem” o ambiente e traduzem estas observações em informação útil (IQBAL et al., 2010). *A. actinomycetemcomitans* é um importante patógeno periodontal, apresentando vários fatores que o tornam potencialmente virulento. Estudos vêm demonstrando a relação entre a detecção de bactérias periodontopatogênicas e a presença de altas concentrações de metaloproteinases e citocinas pró-inflamatórias no fluido gengival de sítios que apresentam progressão da periodontite quando comparados aos sítios inativos (SILVA et al., 2008). Assim, sendo a adesão e invasão, recursos estratégicos utilizados por *A. actinomycetemcomitans* para desencadear a patogenia, é evidente a importância da identificação dos genes expressos neste processo.

Baseados no exposto, consideramos que o estudo de genes ativados pelo contato da bactéria com as células epiteliais poderia elucidar os mecanismos envolvidos na adaptação do microrganismo para interagir com essa primeira barreira do hospedeiro, propiciando a sua colonização. Além disso, a análise do perfil de transcrição de genes associados à via de transdução de sinais da célula epitelial após a infecção com *A.actinomycetemcomitans* permitiria a identificação dos eventos moleculares iniciais promovidos pela presença do patógeno que provocam um desequilíbrio na homeostase do microambiente periodontal, levando ao quadro de destruição tecidual encontrado na periodontite.

6 CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou através da análise da expressão gênica, duas vertentes existentes no processo de infecção, de um lado, a bactéria e do outro, a célula epitelial:

1. *A. actinomycetemcomitans* altera o perfil de transcrição de genes após a interação com células epiteliais gengivais. A regulação da transcrição de certos genes de virulência após contato com a célula epitelial é cepa específica. Além disso, a regulação da transcrição também é dependente do tempo de contato com a célula epitelial. A maior virulência das amostras de *A.actinomycetemcomitans* pertencentes ao sorotipo **b**, em relação à amostra sorotipo **a** pode ser justificada pela regulação positiva de genes associados a maior virulência como *ltx*, que codifica a leucotoxina e *omp29*. Além disso, a interação com células epiteliais induziu a transcrição de genes associados à colonização, como *flp* e *aae*, particularmente nas amostras sorotipo **a**. Por outro lado, diferenças entre as amostras sorotipo **b**, foram detectadas. Embora a cepa JP2 tenha apresentado maior transcrição de *ltx* após cultura *in vitro*, a regulação positiva de *ltx* após contato com célula epitelial por 24 horas na amostra SUNY465, levou a produção de transcritos *ltx* em níveis similares ao observado na amostra JP2, justificando a participação das linhagens sorotipo **b** não JP2 na periodontite agressiva;
2. A transcrição gênica de células epiteliais gengivais sofre alterações após a infecção por *A.actinomycetemcomitans*, sugerindo que o cenário da periodontite agressiva, caracterizado por infiltrado macrofágico e destruição óssea, inicia-se precocemente durante a infecção, após a interação da bactéria com o epitélio.

REFERÊNCIAS

ABDUL-SATER, A. A.; SAID-SADIER, N.; OJCIUS, D. M.; YILMAZ, Ö.; KELLY, K. A. Inflammasomes bridge signaling between pathogen identification and the immune response. **Drugs Today**, v. 45, p. 105-112, 2009.

AIASTUI, A.; PUCCIARELLI, M. G.; GARCIA-DEL-PORTILLO, F. *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* invades fibroblasts by multiple routes differing from the entry into epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 78, p. 2700-2723, 2010.

AKIFUSA, S.; HEYWOOD, W.; NAIR, S.P; STENBECK, G.; HENDEERSON, B. Mechanism of internalization of the cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Microbiol.**, v. 151, p. 1395-1402, 2005.

AMARAL, J. D.; XAVIER, J. M.; STEER, C. J.; RODFRIGUES, C. M. Targeting the p53 pathway apoptosis. **Curr. Pharm. Des.** 2010. (in press)

AMBILI, R.; SANTHI, W. S; JANAM, P.; NANDAKUMAR, K.; PILLAI, M. R. Expression of activated transcription factor nuclear factor-kappaB in periodontally diseases tissues. **J. Periodontol.**, v. 76, p. 1148-1153, 2005.

ANDO, E. S.; DE-GENARO, L. A.; FAVERI, M.; FERES, M.; DiRIENZO, J. M.; MAYER, M. P. A. Immune response to cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in periodontitis patients. **J. Periodontol. Res.**, 2010 (in press), doi:10.1111/j.1600-0765.2009.01260.x

ASAI, Y.; OHYAMA, Y.; GEN, K.; OGAWA, T. Bacterial fimbriae and their peptides activate human gingival epithelial cells through toll-like receptor 2. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 7387-7395, 2001

ASAKAWA, R.; KAWAI, T.; KOMATSUZAWA, H.; YAMADA, S.; GONÇALVES, R. B.; IZUMI, S.; SUZUKI, N.; UCHIDA, Y.; OUHARA, K.; SHIBA, H.; TAUBMAN, M. A.; KURIHARA, H.; SUGAI, M. Outer membrane protein 100, a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Mol. Microbiol.**, v. 50, p. 1125-1139, 2003.

ASSUMA, R.; OATES, T.; COCHRAN, D.; AMAR, S.; GRAVES, D. T. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. **J. Immunol.**, v.160, p. 403-409, 1998.

BELIBASAKIS, G. N.; JOHANSSON, A.; WANG, Y.; CHEN, C.; LAGERGARD, T.; KALFAS, S.; LERNER, U. H. Cytokines responses of human gingival fibroblasts to

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação referências : elaboração. Rio de Janeiro, 2002

Actinobacillus actinomycetemcomitans cytolethal distending toxin. **Cytokine.**, v. 30, p. 56-63, 2005a.

BELIBASAKIS, G. N.; JOHANSSON, A.; WANG, Y.; CHEN, C.; KALFAS, S.; LERNER, U. H. The cytolethal distending toxin induces receptor activator of NF- κ B ligand expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 342-351, 2005b.

BEESMAN, M. J.; WALSH, J. D.; DUNN, C. A.; SWAMINATHAN, J.; WELDON, J. E.; SHEN, J. The gene *ygdP*, associated with the invasiveness of *Escherichia coli K1*, designates a Nudix hydrolase, Orf176, active on adenosine (5')-pentaphospho-(5')-adenosine (Ap5A). **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 37834-37838, 2001.

BLOEMEN, V.; VRIES, T. J.; SHOENMAKER, T.; EVERTS, V. Intercellular adhesion molecule-1 clusters during osteoclastogenesis. **Bioch. Biophys. Res. Commun.**, v. 385, p. 640-645, 2009.

BLOMMFIELD, G. A.; WHITTLW, G.; McDONAGAH, M. B.; KATZ, M. E.; CHEETHAM, B. F. Analysis of sequences flanking the *vap* regions of *Dichelobacter nodosus*: evidence for multiple integration events, a killer system, and a new genetic element. **Microbiology**, v. 143, p. 553-562, 1997.

BOYCE, B. F.; YATES, A. J.; MUNDY, G. R. Bolus injections of recombinant human interleukin-1 cause transient hypocalcemia in normal mice. **Endocrinology**, v. 125, p. 2780-2783, 1989.

BROGAN, J. M.; LALLY, E. T.; POULSEN, K.; KILIAN, M.; DEMUTH, D. R. Regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leucotoxin expression: analysis of the promoter regions of the leucotoxically and minimally leucotoxic strains. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 501-508, 1994.

BRUNHEIRA, A. T. P. Detecção de *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* no biofilme subgengival e títulos séricos IgG contra OMP100 e OMP29. 80 f. Tese (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BUENO, L. C.; MAYER, M. P.; DiRIENZO, J. M. Relationship between conversion of localized juvenile periodontitis susceptible children from health to disease and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leucotoxin promoter structure. **J. Periodontol.**, v. 69, p. 998-1007, 1998

CAO, S. L.; PROGULSE-FOX, A.; HILLMAN, J. D.; HANDFIELD, M. In vivo induced antigenic determinants of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 237, p. 97-103, 2004.

CARVALHO, F. M.; TINOCO, E. M. B.; DEELEY, K.; DUARTE, P. M.; FAVERI, M.; MARQUES, M. R.; MENDONÇA, A. C.; WANG, X.; CUENCO, K.; MENEZES, R.;

GARLET, G. P.; VIEIRA, A. R. FAM5C contributes to Aggressive Periodontitis. **PloS ONE**, v. 5, p. 1-10, 2010.

CHAMMAILARD, M.; GIRARDIN, S. E.; VIALA, J.; PHILPOTT, D. J. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. **Cell. Microbiol.**, v. 5, p. 581-592, 2003.

CLARKE, M. C. H.; FIGG, N.; MAGUIRE, J. J.; DAVENPORT, A. P.; GODDARD, M. et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells features of plaque vulnerability in atherosclerosis. **Nature Med.**, v. 12, p. 1075-1080, 2006.

COCHRAN, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 79, p. 1569-1576, 2008.

CNELLY, J. J.; SHAH, S. H.; DOSS, J. F.; GADSON, S.; NELSON, S. et al. Genetic and functional association of FAM5C with myocardial infarction. **BMC Med. Genet.**, v. 9, p. 33-47, 2008.

CORN, P. G; EL-DEIRY, W. S. Microarray analysis of p-53 dependent gene expression in response to hypoxia and DNA damage. **Cancer Biol. Ther.**, v. 6, p. 1858-1866, 2007.

COSSART, P.; SANSONETTI, P. J. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. **Science**, v. 304, p. 242-248, 2004.

COSTEA, D. E.; DIMBA, A. O. E.; LORO, L. L.; VINTERMYR, O. K.; JOHANNENSEN, A. C. The phenotype of in vitro reconstituted normal human oral epithelium is essentially determined by culture medium. **J. Oral. Pathol. Med.**, v. 34, p. 247-252, 2005.

COSTELO, G. M.; VIPOND, R.; MacINTYRE, S. *Aeromonas salmonicida* possess two genes encoding homologs outer membrane protein, OmpA. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 1623-1630, 1996.

DAYAN, S.; STASHENKO, P.; NIEDERMAN, R.; KUPPER, T. S. Oral epithelial overexpression of IL-1 α causes periodontal disease. **J. Dent. Res.**, v. 83, p. 786-790, 2004.

DARVEAU, R. P.; TANNER, A.; PAGE, R. C. The microbial challenge in periodontitis. **Periodontol 2000**, v. 14, p. 12-32, 1997

DELIMA, A. J.; OATES, T.; ASSUMA, R.; SCHARTZ, Z.; COCHRAN, D.; AMAR, S.; GRAVES, D. T. Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibit loss of tissue attachment in experimental periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, p. 233-240, 2001.

DINARELLO, C. A.; WOLF, S. M. The role of interleukin-1 in disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 328, p. 106-113, 1993.

DOGAN, B.; SAARELA, M. H.; JOUSIMIES-SOMER, H.; ALALUUSUA, S.; ASIKAINEN, S. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype e – biotypes, genetic diversity and distribution in relation to periodontal status. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 14, p. 98-103, 1999.

EICK, S.; REISSMANN, A.; RODEL, J.; SCHMIDT, K. H.; PFISTER, W. *Porphyromonas gingivalis* survives within KB cells and modulates inflammatory response. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 21, p. 231-237, 2006

ESKAN, M. A., BENAKANAKERE, M. R.; ROSE, B. G.; ZHANG, P.; ZHAO J., STATHOPOULOU, P.; FUJIOKA, D. ; KINANE, D.F. Interleukin-1 β modulates pro-inflammatory cytokine production in human epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 2080-2089, 2008a.

ESKAN, M. A.; ROSE, B. G.; BENAKANAKERE, M. R.; ZENG, Q.; FUJIOKA, D.; MARTIN, M. H.; LEE, M. J.; KINANE, D. F. TLR4 receptors cooperate to enhance inflammatory cytokine production in human gingival epithelial cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 38, p. 1138-1147, 2008b.

FABRIS, A. S.; DiRIENZO, J. M.; WIKSTRÖM, M.; MAYER, M. P. Detection of cytolethal distending toxin activity and cdt genes in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates from geographically diverse populations. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 17, p. 231-238, 2002.

FAVERI, M.; FIGUEIREDO, L. C.; DUARTE, P. M.; MESTNIK, M. J.; MAYER, M. P. A.; FERES, M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 36, p. 739-749, 2009.

FERNANDES, J. C.; SHI, Q.; BENDERDOUR, M.; LAJEUNESSE, D.; LAVIGNE, P. An active role for soluble and membrane intercellular adhesion molecule -1 in osteoclast activity in vitro. **J. Bone Miner. Metab.**, v. 26, p. 543-550, 2008.

FERNANDES, K.P.; MAYER, M.P.; ANDO, E.S.; ULRICH, A.G.; AMARENTE-MENDES, J.G.; RUSSO, M. Inhibition of interferon-gamma- induced nitric oxide production in endotoxin-activated macrophages by cytolethal distending toxin. **Oral Microbiol Immunol.**, v. 23, p. 360–366, 2008.

FINE, D. H.; FURGANG, D.; KAPLAN, J.; CHARLESWORTH, J.; FIGURSKI, D. H. Tenacious adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain CU1000 to salivary-coated hydroxyapatite. **Arch. Oral Biol.**, v. 44, p. 1063-1076, 1999.

FINE, D. H.; KAPLAN, J. B.; KACHLANY, S. C.; SCHEREINER, H. C. How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a model for infectious diseases. **Periodontol 2000**, v. 42, p. 114-157, 2006.

FINE, D. H.; MARKOWITZ, K., FURGANG, D.; FAIRLIE, K.; FERRANDIZ, J.; NASRI, C.; et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 3859-3869, 2007.

FIVES-TAYLOR, P. M.; MEYER, D. H.; MINTZ, K. P.; BRISSETTE, C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Periodontol 2000**, v. 20, p. 236-167.

FRANK, L.; WARNER, N.; VIANI, K.; NUÑEZ, G. Function of Nod-receptors in microbial recognition and host defense. **Immunol. Rev.**, v. 227, p. 106-128, 2009.

FREUDL, R.; COLE, S. T. Cloning and molecular characterization of the *ompA* gene from *Salmonella typhimurium*. **Eur. J. Biochem.**, v. 134, p. 497-502, 1983.

FUKUSHIMA, H.; JIMI, E.; OKAMOTO, F.; MOTOKAWA, W.; OKABE, K. IL-1 induced receptor activator of NF- κ B ligand in human periodontal ligament cells involves ERK-dependent PGE₂ production. **Bone**, v. 36, p. 267-275, 2005.

GARLET, G. P.; MARTINS, W. Jr.; FERREIRA, B. R.; MILANEZI, C. M.; SILVA, J. S. Patterns of chemokines and chemokines receptors expression in different forms of human periodontal disease. **J. Periodont. Res.**, v. 38, p. 210-217, 2003.

GAYWEE, J.; XU, W.; RADULOVIC, S.; BESSMAN, M. J.; AZAD, A. F. The *Rickettsia prowazekii* invasion gene homolog (*inv A*) encodes a nudix hydrolase active on adenosine (5')-pentaphospho-(5')-adenosine. **Mol. Cell Proteomics**, v. 1, p. 179-183, 2002.

GEORGELLIS, D.; KWON, O.; LIN, E. C.; WONG, S. M.; AKERLEY, B. J. Redox signal transduction by the ArcB sensor kinase of *Haemophilus influenzae* lacking the PAS domain. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 7206-7212, 2001.

GIRARDIN, S. E.; BONECA, I. G.; CARNEIRO, L. A.; ANTIGNAC, A.; JEHANO, M.; VIALA, J.; TEDIN, K.; TAHA, M.K; LABIGNE, A.; ZAHRINGER et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. **Science**, v. 300, p. 1584-1587, 2003.

GIRARDIN, S. E., TOURNEBIZE, R.; MAVRIS, M.; PAGE, A. L.; LI, X.; STARK, G. R.; BERTIN, J.; DiSTEFANO, P. S.; YANIV, M.; SANSONETTI, P. J.; PHILPOTT, D. J. CARD4/NOD1 mediates NF- κ B and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. **EMBO Rep.**, v. 2, p. 736-742, 2001.

GORJALA, P.; GARY, R. K. Beryllium sulfate induces p21^{CDKN1A} expression and a senescence-like cell cycle arrest in a susceptible cancer types. **Biometals**, 2010, doi: 10.1007/s10534-010-9352-y

GOWEN, M.; WOOD, D. D.; IHRIE, E. J.; McGUIRE, M. K.; RUSSEL, R. G. An interleukin-1 like factor stimulates bone resorption in vitro. **Nature**, v. 306, p. 378-380, 1983.

GRAVES, D. T.; OSKUI, M.; VOLEJNIKOVA, S.; NAGUIB, G.; CAI, S.; DETA, T.; KAKOURAS, A.; JIANG, Y. Tumor necrosis factor modulates fibroblast apoptosis, PMN recruitment and osteoclast formation in response to *P. gingivalis* infection. **J. Dent.Res.**, v. 80, p. 1875-1879, 2001.

GRAVES, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. **J. Periodontol.**, v.79, p.1585-1591, 2008.

HAASE, E. M.; ZMUDA, Z. L.; SCANNAPIECO, F. A. Identification and molecular analysis of rough-colony-specific outer membrane proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, v. 67, p .2901-2908, 1999.

HAASE, E. M.; STREAM, J. O.; SCANNAPIECO, F. A. Transcriptional analysis of the 5' terminus of the flp fimbrial gene cluster from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Microbiology**, v. 149, p. 206-216, 2003.

HAN, X.; LIN, X.; SELIGER, A. R.; EASTCOTT, J.; KAWAI, T.; TAUBMAN, M. A. Expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand by B cells in response to oral bacteria. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 24, p. 190-196, 2009.

HANDFIELD, M.; BRADY, L. J.; PROGULSE-FOX, A.; HILLMAN, J. D. IVIAT: a novel method to identify microbial genes expressed specifically during human infections. **Trends Microbiol.**, v. 8, p. 336-338, 2000.

HANDFIELD, M.; MANS, J. J.; ZHENG, G.; LOPEZ, M. C.; MAO, S.; PROGULSKE-FOX, A.; NARASIMHAN, G.; BAKER, H. V.; LAMONT, R. J. Distinct transcriptional profiles characterize oral epithelium-microbiota interactions. **Cell. Microbiol.**, v. 7, p. 811-823, 2005.

HASEGAWA, Y.; TRIBBLE, G. D.; BAKER, H. V.; MANS, J. J.; HANDFIELD, M.; LAMONT, R. J. Role of *Porphyromonas gingivalis* SerB in gingival epithelial cell cytoskeletal remodeling and cytokine production. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 2420-2427, 2008.

HENDERSON, B.; NAIR, S. P.; WARD, J. M.; WILSON, M. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 57, p. 29-55, 2003.

HODGE, J. M.; KIRKLAND, M. A.;AITKEN, C. J.; WAUGH, C. M.; DAMIAN, E. M; LOPEZ, C. M.; ADAMS, B. E, NICHOLSON, G. C. Osteoclastic potential of human CFU-GM: Biphasic effect of GM-CSF. **J. Bone Mineral Res.**, v. 19, p. 190-199, 2004a

HODGE, J. M.; KIRKLAND, M. A.; NICHOLSON, G. C. GM-CSF cannot substitute for M-CSF in human osteoclastogenesis. **Bioch. Biophys. Res. Commun.**, v. 321, p. 7-12, 2004b.

HUANG, G. T.; ZHANG, H. B.; DANG, H. N; HAAKE, S. K. Differential regulation of cytokine genes in gingival epithelial cells challenge by *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*. **Microb. Pathog.**, v. 37, p. 303-312, 2004.

INOHARA, N.; KOSEKI, T.; DEL PESO, L.; HU, Y.; YEE, C.; CHEN, S. Nod1, an Apaf-1 like activator of caspase-9 and nuclear factor kappaB. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 14560-14567, 1999.

ISHIHARA, Y.; NISHIHARA, T.; MAKI, E.; NOGUSHI, T.; KOGA, T. Role of interleukin-1 and prostaglandin in vitro bone resorption induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. **J. Periodontal Res.**, v. 26, p. 155-160, 1991.

ISMAIL, T. M.; HARTS, C. A.; McLENNAN, A. G. Regulation of dinucleoside polyphosphate pools by the ygdh and apaH hydrolases is essential for the ability of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to invade cultured mammalian cells. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 32602-32607, 2003.

IQBAL, J.; SUN, L.; ZAID, M. Complexity in signal transduction. **Annu. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1192, p. 238-244, 2010.

JANEWAY, C. Jr.; MEDZHITOY, R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v.20, p. 197-216, 2002.

JUNTILLA, M. R.; LI, S. P.; WESTERMACK, J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. **FASEB J.**, v. 22, p. 954-965, 2008.

KACHLANY, S. C.; PLANET, P. J.; BHATTACHAJEE, M. K.; KOLLIA, E.; De SALLE, R.; FINE, D. H; FIGURSKI, D. H. Nonspecific adherence by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* requires genes widespread in bacteria and archaea. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 6169-76, 2000.

KACHLANY, S. C.; PLANET, P. J.; DeSALLE, R.; FINE, D. H.; FIGURKI, D. H.; KAPLAN, J. B. *flp-1*, the first representative of a new pilin gene subfamily, is required for non-specific adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Mol. Microbiol.**, v. 40, p. 542-554, 2001.

KACHLANY, S. C. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: from threat to therapy. **J. Dent. Res.**, 2010 (in press). doi: 10.1177/0022034510363682

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

KAPLAN, J. B.; KOKEGUCHI, S.; MURAYAMA, Y.; FINE, D. H. Sequence diversity in the major fimbrial subunit gene (flp-1) of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 17, p. 354-359, 2002.

KAPLAN, J. B.; SCHREINER, H. C.; FURGANG, D.; FINE, D. H. Population structure and genetic diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains isolated from localized juvenile periodontitis patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 1181-1187, 2002b.

KAPLAN, J. B.; MEYENHOFER, M. F.; FINE, D. A. Biofilm growth and detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 1399-1404, 2003.

KAPLAN, J. B.; VELLIYAGOUNDER, K.; RAGUNATH, C.; ROHDE, H.; MACK, D.; KNOBLOCK, J. K.; RAMASUBBU, N. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. **J Bacteriol.**, v. 186, p. 8213-8220, 2004.

KARCHED, M.; SATYASEELA, P. M.; ASIKAINEN, S. A simple viability-maintaining method produces homogenic cell suspensions of autoaggregating wild-type *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Microbiol. Methods.**, v. 68, p. 46-51, 2007.

KAWAI, T.; MATSUYAMA, T.; HOSOKAWA, Y. et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. **Am. J. Pathol.**, v. 169, p. 987-999, 2006.

KAWAMOTO, D.; ANDO, E. S.; LONGO, P. L.; NUNES, A. C.; WIKSTRÖM, M.; MAYER, M. P. Genetic diversity and toxic activity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolates. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v. 24, p. 493-501, 2009.

KAWANO, H.; NAKATANI, T. ; MORI, T. ; UENO, S. ; FUKAYA, M. ; et al. Identification and characterization of novel development regulates neural-specific proteins, BRINP family. **Mol. Brain. Res.** v. 12, p. 60-75, 2004.

KIKKERT, R.; LAINE, M. L.; AARDEN, L.A.; VAN WINKELHOFF, A. J. Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 22, p.145-151, 2007

KIKUCHI, T.; HAHN, C. L.; TANAKA, S.; BARBOUR, S. E.; SCHENKEIN, H. A.; TEW, J. G. Dendritic cells stimulated with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* elicit rapid gamma interferon responses by natural killer cells. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 5089-5096, 2004.

KIRKWOOD, K. L.; ROSSA, C. Jr. The potential of p38 MAPK inhibitors to modulate periodontal infectious. **Curr. Drug Metabolism.**, v. 10, p. 1-12, 2009

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

KOMATSUZAWA, H.; KAWAI, T.; WILSON, M. E.; TAUBMAN, M.A.; SUGAI, M.; SUGINAKA, H. Cloning of the gene encoding of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b OmpA-like outer membrane protein. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 942-945, 1999.

KOMATSUZAWA, H.; ASAOKAWA, R.; KAWAI, T.; OCHIAI, K.; FUJIWARA, T.; TAUBMAN, M. A.; OHARA, M.; KURIHARA, H.; SUGAI, M. Identification of six major outer membrane proteins from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Gene**, v. 17, p. 195-201, 2002.

KRISANAPRAKORNKIT, S.; KIMBALL, J. R.; WEINBERG, A.; DARVEAU, R. P.; BAINBRIDGE, B. W.; DALE, B. A. Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 2907-2915, 2000.

KUSUMOTO, Y.; HIRANO, H.; SAITO, K.; YAMADA, S.; TAKEDACHI, M.; NOZAKI, T. et al. Human gingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 after stimulation with *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptors 2. **J. Periodontol.**, v.74, p. 370-379, 2004.

LALLY, E. T.; KIEBA, I. R.; DEMUTH, D. R.; ROSENBLUM, J.; GOLUB, E. E.; TAICHMAN, N. S.; et al. Identification and expression of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin gene. **Bioch. Biophys. Res. Commun.**, v. 159, p. 256-262, 1989.

LÉVÈQUE, F.; BLANCHIN-ROLAND, S.; FAYAT, G.; PLATEAU, P.; BLANQUET, S. Desing an characterization of *Escherichia coli* mutants devoid of Ap4N-hydrolase activity. **J. Mol. Biol.**, v. 212, p. 319-329, 1990.

LEE, S.; HARRIS, S. E.; ROODMAN, G. D.; SPRAGUE, E.; BONEWALD, L. F.; Chemotaxis a potential mechanism whereby osteocytes target osteoclasts precursors to bone. **J. Bone Miner Res.** 15 (1 Suppl): 208, 2000.

LI, L.; MATEVSKI, D.; ASPIRAS, M.; ELLEN, R. P.; LEPINE, G. Two epithelial cell invasion-related loci of the oral pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 19, p. 16-25, 2004.

LONGO, P. L. Construção, análise de fenótipo e da transcrição gênica de uma amostra mutante de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* deficiente em *arcB*. São Paulo. [Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo], 111 p, 2008

LU, X.; MASIC, A.; LI, Y.; SHIN, Y.K.; LIU, Q.; ZHOU, Y. The pI13K/Akt pathway inhibits influenza A virus induced Bax-mediated apoptosis by negatively regulating the JNK pathway via ASK. **J. Gen. Virol.**, v. 91, p. 1439-1449, 2010.

MARANDI, M; MITTAL, K. R. Characterization of an outer membrane protein of *Pasteurella multocida* belonging to the OmpA family. **Vet. Microbiol.**, v. 53, p. 303-314, 1996.

MAYER, M. P. A.; BUENO, L. C.; HANSEN, E. J.; DIRIENZO, J. M. Identification of a cytolethal distending toxin gene locus and features of a virulence associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 1227-1237, 1999.

McBRIDE, H. M.; NEUSPIEL, M.; WASIAK, S. More than just a powerhouse. **Curr. Biol.**, v. 16, p. 551-560, 2006.

MERIACHTCHERIAKOVA, D.; SCHABBAUER, G.; LUCERNA, M.; CLAUSS, M.; MARTIN, R., BINDER, B. R.; HOFER, E. Specificity, diversity, and convergence in VEGF and TNF- α signaling events leading to tissue factor upregulation via EGR-1 in endothelial cells. **FASEB J.**, v. 15, p. 230-242, 2001

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

MEYER, D. H; FIVES-TAYLOR, P. M. Characteristics of adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 928-935, 1994

MEYER, D. H.; FIVES-TAYLOR, P. M. Models of invasion of enteric and periodontal pathogens into epithelial cells. A comparative analysis. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 8, p. 389-409, 1997.

MILWARD, M. R.; CHAPLE, I. L. C.; WRIGHT, H. J.; MILLARD, J. L.; MATTHEWS, J. B.; COOPER, P. R. Differential activation of NF- κ B and gene expression in oral epithelial cells by periodontal pathogens. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 148, p. 307-324. 2007;

MINTZ, K. P.; FIVES-TAYLOR, P. M. Adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to a human oral cell line. **Infect Immun.**, v. 62, p. 3672-8, 1994.

MINTZ, K. P. Identification of an extracellular matrix protein adhesion, EmaA, which mediates the adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to collagen. **Microbiology**, v. 150, p. 2677-2688, 2004.

MITCHELL, S. J.; MINNICK, M. F. Characterization of two-gene locus from *Bartonella bacilliformis* associated with the ability to invade human erythrocytes. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 1552-1562, 1995.

MITCHELL, C.; GAO, L.; DEMUTH, D. R. Positive and negative cis-acting regulatory sequences control expression of leukotoxin in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 5640-5649, 2003.

MITTAL, R.; PRASADARAO, N. V. Outer membrane protein A expression in *Escherichia coli* K1 is required to prevent the maturation of myeloid dendritic cells and the induction of IL-10 and TGF- β . **J. Immunol.**, v. 181, p. 2672-2682, 2008.

MIYASAKI, K. T.; WILSON, M. E.; REYNOLDS, H. S.; GENCO, R. J. Resistance of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and differential susceptibility of oral *Haemophilus* species to the bactericidal effects of hydrogen peroxide. **Infect. Immun.**, v. 46, p. 644-648, 1984.

MOLTÓ, A.; OLIVÉ, A. Anti-IL-1 molecules: new comers and new indications. **Joint Bone Spine**, v. 77, p. 102-107, 2010.

MUHLE, I.; RAU, J.; RUSKIN, J. Vertebral osteomyelitis due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **JAMA**, v. 241, p. 1824-1825, 1979.

MUNSON, R. S. Jr; GRASS, S.; WEST, R. Molecular cloning and sequence of the gene for outer membrane protein P5 of *Haemophilus influenza*. **Infect Immun.**, v. 61, p. 4017-4020, 1993.

MUTHUSAMY, V.; PIVA, Y. J. The UV response of the skin: a review of the MAPK, NFkB and TNF α signal transduction pathways. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 302, p. 5-17, 2010.

NAIDU, K. A.; FANG, Q.; NAIDU, A. A.; CHENG, J. Q.; NICOSIA, S. V.; COPPOLA, D. p53 enhances ascorbyl stearate-induced G2/M arrest of human cancer cells. **Anticancer Res.**, v. 27, p. 3927-3934, 2007

NALBANT, A.; CHEN, C.; WANG, Y.; ZADEH, H. H. Induction of T-cell apoptosis by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* mutants with deletion of ltxA and cdtABC genes: possible activity of GroEL-like molecule. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 18, p. 339-349, 2003.

NIKAIDO, H.; WU, H. C. P. Amino acid sequence homology among the major outer membrane proteins of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 81, p. 1048-1052, 1984.

NISHIDA, E.; HARA, Y.; KANEKO, T.; IKEDA, Y.; UKAI, T, KATO, I. Bone resorption and local interleukin1-alpha and interleukin1-beta synthesis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. **J. Periodontal Res.**, v. 36, p. 1-8, 2001.

NOGUSHI, T.; SHIBA, H.; KOMATSUZAWA, H.; MIZUNO, N.; UCHIDA, Y.; OUHARA, K.; ASAKAWA, R.; KUDO, S.; KAWAGUSHI, H.; SUGAI, M.; KURIHARA, H. Syntesis of prostaglandin E2 and E-cadherin and gene expression of beta defensin2 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Inflammation**, v. 27, p. 341-349, 2003.

NOMURA, K.; KURODA, S.; YOSHIKAWA, H.; TOMITA, T. Inflammatory osteoclastogenesis can be induced by GM-CSF and activated under TNF immunity. **Bioch. Biophys. Res. Commun.**, v. 367, p. 881-887, 2008.

NORSKOV-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.**, v. 56, p. 2135-2146, 2006

O'DEA, E.; HOFFMANN, A. NF- κ B signaling. **Wiley Interdiscipli. Rev. Syst. Biol. Med.**, v.1, p. 1-13, 2009.

OGURA, K.; MAEDA, S.; NAKAO, M.; WATANABE, T.; TADA, M.; KYUTOKU, T.; YOSHIDA, H.; SHIRATORI, Y.; OMATA, M. Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gatric diseases in Mongolian gerbil. **J. Expr. Med.**, v. 192, p. 161-1610, 2000.

OPITZ, B.; PUSHEL, A.; BEERMANN, W.; HOCKE, A. C.; FOSTER, S.; SCHMECK, B.; VAN LAAK, V.; CHAKRABORTY, T.; SUTTORP, N.; HIPPENSTIEL, S. Listeria monocytogenes activated p38 MAPK and induced IL-8 secretion in a nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent manner in endothelial cells. **J. Immunol.**, v. 176, p. 484-490, 2006.

OUHARA, K.; KOMATSUZAWA, H.; SHIBA, H.; UCHIDA, Y.; KAWAI, T.; SAYAMA, K.; HASHIMOTO, K.; TAUBMAN, M. A.; 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.**, v. 74, p. 5211-5220, 2006.

PAGE, M. I.; KING, E. O. Infection due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. **New Eng. J. Med.**, v. 275, p. 181-188, 1966.

PAJU, S.; SAARELA, M.; ALALUUSUA, S.; FIVES-TAYLOR, P.; AISIKAINEN. Characterization of Serologically Nontypeable *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 7, p. 2019-2022, 1998.

PANAGAKOS, F. S.; HINOJOSA, L. P.; KUMAR, S. Formation and mineralization of extracellular matrix secreted by an immortal human osteoblastic cell line: modulation by tumor necrosis factor-alpha. **Inflammation**, v. 18, p. 267-284, 1994.

PATUREL, L.; CASALTA, J. P.; HABIB, G.; NEZRI, M.; RAOULT, D. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* endocarditis. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 10, p. 98-118, 2004.

PEREZ, B. A.; PLANET, P. J.; KACHLANY, S. C.; TOMICH, M.; FINE, D. H.; FIGURSKI, D. H. Genetic analysis of the requirement for *fip-2*, *tadV* and *rcpB* in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm formation. **J. Bacteriol.**, v. 188, p. 6361-6375, 2006.

PFAFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLE, L. Relative expression software tool (REST) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, p. 9-36, 2002.

PIMENTA, G.; PASCUAL, J. Canonical and alternative MAPK signaling. **Cell Cycle**, v. 6, p. 2628-2632, 2007.

PINHEIRO, E. T.; KAWAMOTO, D.; OTA-TSUZUKI, C.; CARVALHO, A.; ALMEIDA, L. R. S.; NUNES, A. C. R.; LONGO, P. L.; WIKSTROM, M.; MAYER, M. P. A. Analysis of genotypic variation in genes associated with virulence in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* clinical isolates. **Mol. Oral Microbiol.**, 2010 (submetido)

PIZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. **Cell**, v. 124, p. 715-727, 2006.

PRASADARAO, N. V.; WASS, C. A.; KIM, K. S. Endothelial cell GlcNAc epitopes for outer membrane protein A enhance traversal of *Escherichia coli* across the blood-brain barrier. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 254-160, 1996.

PRITCHARD, M. T.; ROYCHOWDHURY, S.; McMULLEN, M. R.; GUO, L.; ARTEEL, G. E.; NAGY, L. E. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 293, p. 1124-1133, 2007.

PULENDRA, B.; KUMAR, P.; CUTLER, C. W.; MOHAMADZEDEH, M.; VAN DYKE, T.; BANCHAREAU, J. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses *in vivo*. **J. Immunol.**, v. 167, p. 5067-5073, 2001.

RABIN, S. D.; FLITTON, J. G.; DEMUTH, D. R. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin induces apoptosis in nonproliferating macrophages by a phosphatase-independent mechanism. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 3161-3169, 2009.

RAMASUBBU, N.; THOMAS, L. M.; RAGUNATH, C.; KAPLAN, J. B. Structural analysis of dispersin B, a biofilm-releasing glycoside hydrolase from the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Mol. Biol.**, v. 349, p. 75-486, 2005.

RE, F.; STROMINGER, J. L. Toll-like receptor 2(TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 37692-37690, 2001.

RICHARDSON, J.; CRAIGHEAD, J. C.; CAO, S. L.; HANDFIELD, M. Concurrence between the gene expression pattern of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized aggressive periodontitis and in human epithelial cells. **J. Med. Microbiol.**, v. 54, p. 497-504, 2005.

ROBERTS, F. A.; McCAFFERY, K. A.; MICHALEK, S. M. Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodontitis. **J. Dent. Res.**, v. 76, p. 1808-1814, 1997.

ROSE, J. E.; MEYER, D. H.; FIVES-TAYLOR, P. M. Aae, an autotransporter involved in adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 2384-2393, 2003.

SAARELA, M.; AISIKAINEN, S.; ALALUUSUA, S.; PYHÄLÄ, L.; LAI, C. H.; JOUSIMIES-SOMER, H. Frequency and stability of mono-and poly-infection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, b, c, d or e. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 7, p. 277-279, 1992.

SAARELA, M.; ASIKANEN, S.; ALALUUSUA, S.; FIVES-TAYLOR, P. M. apaH Polymorphism in clinical *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates. **Clin. Microbiol.**, v. 4, p. 139-144, 1998.

SAARELA, M.; LIPPMAN, J. E.; MEYER, D. H.; FIVES-TAYLOR, P. M. The *Actinobacillus actinomycetemcomitans* apaH gene is implicated in invasion of epithelial cells. **J. Dent. Res.**, v. 78 (Spec. issue): 1225, 1999.

SANDROS, J.; KARLSSON, C.; LAPPIN, D. F.; MARIANTONIO, P. N.; KINANE, D. F.; PAPANOU, P. N. Cytokine response of oral epithelial cells to *Porphyromonas gingivalis* infection. **J. Dent. Res.**, v. 79, p. 1808-1814, 2000.

SATO, T.; KOSEKI, T.; YAMATO, K.; SAIKI, K.; KONISHI, K.; YOSHIKAWA, M.; ISHIKAWA, I.; NISHIHARA, T. p-53-independent expression of p-21CIP/WAF1 in plasmacytic cells during G2 cell cycle arrest induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 528-534, 2002.

SCANNAPIECO, F. A., MILLAR, S. J.; REYNOLDS, H. S.; ZAMBON, J. J.; LEVINE, M. J. Effects of anaerobiosis on the surface proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Haemophilus actinomycetemcomitans*). **Infect. Immun.**, v. 55, p. 2320-2323, 1987.

SCANNAPIECO, F. A.; WANG, B.; SHIAU, H. J. Oral bacteria and respiratory infection: effects on respiratory pathogen adhesion and epithelial cell proinflammatory cytokine production. **Ann. Periodontol.**, v. 6, p. 78-86, 2001.

SCHETT, G. Osteoimmunology in rheumatic diseases. **Arthritis Res. Ther.**, v. 11, p. 210, 2009.

SCHYTTE-BLIX, I. J.; HELGELAND, K.; HVATTUM, E.; LYBERG, T. Lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* stimulates production of interleukin-1beta, tumor necrosis-alpha, interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in human whole blood. **J. Periodontal Res.**, v. 34, p. 34-40, 1999.

SEYDEL, F.; GARRIGAN, E.; STUTEVOSS, B.; BELKIN, N.; MAKADIA, B.; CARTER, J.; SHI, J. D., DAVOODI-SEMIROMI, A.; McDUFFIE, M.; LITHERLAND, S. A. GM-CSF induces STAT5 binding at epigenetic regulatory sites within the Csf2 promoter of obese diabetic (NOD) mouse myeloid cells. **J. Autoimmun.**, v. 31, p. 377-384, 2008.

SHALE, M.; GOSH, S. How intestinal epithelial cells tolerise dendritic cells and its relevant to inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 58, p. 1291-1299, 2009.

SHENKER, B. J.; MCKAY, T.; DATAR, S.; MILLER, M.; CHOWHAN, R.; DEMUTH, D. R. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* immunosuppressive protein is a member of the family of cytolethal distending toxins capable of causing a G2 arrest in human T cells. **J. Immunol.**, v. 167, p. 4773-4780, 1999.

SHENKER, B. J.; HOFFMASTER, R. H., McKAY, T. L.; DEMUTH, D. R. Expression of the cytolethal distending toxin (Cdt) operon in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: evidence that the CdtB protein is responsible for G2 arrest of the cells cycle in human T cells. **J. Immunol.**, v. 165, p. 2612-2618, 2000.

SHENKER, B.; HOFFMASTER, R. H.; ZEKAVAT, A.; YAMAGUCHI, N.; LALLY, E. T.; DEMUTH, D. R. Induction of apoptosis in human T cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin is a consequence of G2 arrest of the cell cycle. **J. Immunol.**, v. 167, p. 435-441, 2001.

SHIMADA, T.; SUGANO, N.; NISHIHARA, R.; SUZUKI, K.; TANAKA, H.; ITO, K. Differential effects of five *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains on gingival epithelial cells. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 23, p. 455-458, 2008.

SHORTS-CARY, L.; XU, M.; ERTEL, J.; KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B. K.; LILLEHEI, K. et al., Bone morphonegetic protein and retinoic acid-inducible neural specific protein-3 is expressed in gonadotrope cells pituitary adenomas and induces proliferation, migration, and invasion. **Endocrinology**, v. 148, p. 967-975, 2007.

SILVA, N.; DUTZAN N.; HERNANDEZ, M.; DEZEREGA, A.; RIVERA, O.; AGUILLO, J. C.; ARAVENA, O.; LASTRES, P.; POZO, P.; VERNAL, R.; GAMONAL, J. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. **J. Clin. Periodontol.**, v. 35, p. 206-214, 2008.

SKERKER, J. M.; SHAPIRO, L. Identification and cell cycle control of a novel pilus system in *Caulobacter crescentus*. **EMBO J.**, v. 19, p. 3223-3234, 2000.

SLOTS, J.; GENCO, R. J. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. **J. Dent. Res.**, v. 63, p. 412-421, 1984.

SLOTS, J. Bacterial specificity in adult periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 13, p. 912-917, 1986.

SMITH, J. L.; BAYLES, D. O. The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 32, p. 227-248, 2006.

SMITH, S. G. J.; MAHON, V.; LAMBERT, M. A.; FAGAN, R. P. A molecular swiss army knife: OmpA structure, function and expression. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 273, p. 1-11, 2007.

SONG, Y. H.; KOZAROV, E. V.; WALTERS, S. M.; CAO, S. L.; HANDFIELD, M.; HILLMAN, J. D.; PROGULSE-FOX, A. Genes of periodontopathogens expressing during human disease. **Ann. Periodontol.**, v. 7, p. 38-42, 2002.

SONTEG, I.; SCHWARZ, H; HIROTA, Y.; HENNING, U. L. F. Cell envelope and shape of *Escherichia coli*: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins. **J. Bacteriol.**, v. 136, p. 280-285, 1978.

SPINATZEL, J. Jr.; KRAIG, E.; KOLODRUBETZ, D. Regulation of leukotoxin in leukotoxic and nonleukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 1394-1401, 1991.

SPINOLA, S. M.; GRIFFITHS, G. E.; SHANKS, K. L.; BLAKE, M. S. The major outer membrane protein of *Haemophilus ducreyi* is a member of the OmpA family of proteins. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 1346-1351, 1993.

SUGAI, M.; KAWAMOTO, T.; PERES, S. Y.; UENO, Y.; et al. The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytolethal distending toxin. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 5008-5019, 1998.

SUGIYAMA, A.; UEHARA, A.; IKI, K.; MATSUSHITA, K.; NAKAMURA, R.; OGAWA, T.; SUGAWARA, S.; TAKADA, H. Activation of human gingival epithelial cells by cell-surface components of blackpigmented bacteria: Augmentation of production of interleukin-8, granulocyte colony stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and expression of intercellular adhesion molecule 1. **J Med Microbiol.**, v. 51, p. 27-33, 2002.

TAKAHASHI, N.; KOBAYASHI, M.; TAKAKI, T.; TAKANO, K.; MIYATA, M.; OKAMATSU, Y.; HASEGAWA, K.; NISHIHARA, T.; YAMAMOTO, M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide stimulates collagen phagocytosis by human gingival fibroblasts. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 23, p. 259-264, 2008.

TAKANAYAGI, H.; KIM, S.; MATSUO, K.; SUZUKI, H.; SUZUKI, T.; SATO., K.; YOKOSHI,T.; ODA, H.; NAKAMURA, K.; IDA, N.; WAGNER, E. F.; TANIGUSHI, T. RANKL maintains bone homeostasis though c-Fos dependent induction of interferon- β . **Nature**, v. 416, p. 744-749, 2002.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 335-376, 2003.

TANCHAROEN, S.; MATSUYAMA, T.; ABEYAMA, K.; MATSUSHITA, K.; KAWAHARA, K.; SANGALUNGKARN, V.; TOKUDA, M.; HASHIGUSHI, T.; MARUYAMA, I.; IZUMI, Y. The role of water channel Aquaporin 3 in the mechanism of TNF- α mediated proinflammatoy events: implication in periodontal inflammation. **J. Cell Phisiol.**, v. 217, p. 38-349, 2008

TANG, P.; FOUBISTER, V.; PUCCIARELLI, M. G.; FINLAY, B. B. Methods to study of bacterial invasion. **J. Microbiol. Methods**, v. 18, p. 227-240, 1993.

TENG, Y. T. A.; HU, W. Expression cloning of a periodontits-associated apoptotic efector, cage homologue, in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Bioch. Biophys. Res. Commun.**, v. 303, p. 1086-1094, 2003.

TIRANATHANAGUL, S. ; YONGCHAITRAKUL, T. ; PATTAMAPUN, K. ; PAVASANT, P. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide activates matrix metalloproteinase-2 and increases receptor activator of nuclear factor-kappa ligand expression in human periodontal ligament cells. **J. Periodontol.**, v. 75, p. 1647-1654, 2004.

TOMICH, M.; FINE, D. H.; FIGURSKI, D. H. The TadV of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a novel aspartic acid prephilin peptidase required for maturation of the Flp1 pilin and TadE and TadF pseudopilins. **J. Bacteriol.**, v. 188, p. 6899–6914, 2006.

TOMICH, M.; PLANET, P. J.; FIGURSKI, D. H. The tad locus: postcards from the widespread colonization island. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, p. 363-375, 2007.

TRABANDT, A.; GAY, R. E.; SUKHATME, V. P.; GAY, S. Expression of collagenase and potential transcriptional factors c-fos and egr-1 in periodontal gingival fibroblasts. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 21, p. 232-240, 1992.

TYLER, C. D.; LICHTI, C. F.; DIEKMAN, A. B.; FOLEY, S. L. Evaluation of differentially expressed proteins following serum exposure in avian pathogenic *Escherichia coli*. **Avian Dis.**, v. 52, p. 23-27, 2008.

UEHARA, A.; FUJIMOTO, Y.; FUKASE, K.; HARUHIKO, T. Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. **Mol. Immunol.**, v. 44, p. 3100-3111, 2007.

UEKI, K.; FRUMAN, D. A.; BRACHMANN, S. M.; TSENG, Y. H.; CANTLEY, L. C.; KAHN, R. Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cells signaling and survival. **Mol. Cell. Biol.**, v. 22, p. 965-977, 2002.

WANG Y. The function of OmpA in *Escherichia coli*. **Bioch. Biophys. Res. Comm.**, v. 292, p. 396-401, 2002

WANG, Y.; LIU, A.; CHEN, C. Genetic basis for conversion of rough-to-smooth colony morphology in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 3749-3753, 2005.

WEI, S.; KITAURA, H.; ZHOU, P. et al. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. **J. Clin. Invest.**, v. 115, p. 282-290, 2005.

WEISER, J. N.; GOTSCHLICH, E. C. Outer membrane protein A (OmpA) contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* K-1. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 2252-2258, 1991.

WILSON, M. E. The heat modifiable outer membrane protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: relationship to ompA proteins. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 2505-2507, 1991a.

WILSON, M. IgG antibody response of localized juvenile periodontitis patients to the 29 kilodalton outer membrane protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Periodontol.**, v. 62, p. 211-218, 1991b.

WILSON, M.; HENDERSON, B. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* relevant to the pathogenesis of inflammatory periodontal disease. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 17, p. 365-379, 1995.

WU, H. H.; YANG, Y. Y.; HSIEH, W. S.; LEE, C. H.; LEU, S. J.; CHEN, M. R. OmpA is the critical component for *Escherichia coli* invasion-induced astrocyte activation. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 68, p. 677-690, 2009.

VIALA, J. C.; CHAPUT, A.; BONECA, I. G.; CARDONA, A.; GIRARDIN, S. E.; MORAN, S.; HUERRE, M. R.; COYLE, A. J. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. **Nat. Immunol.**, v. 5, p. 1166-1174, 2004.

YAMAMOTO, M.; TAKEDA, K. Role of nuclear IkB proteins in the regulation of host immune response. **J. Infect. Chemother.**, v. 14, p. 265-269, 2008.

YANG, H. W.; AISIKAINEM, S.; DOGAN, B.; SUDA, R.; LAI, C. H. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b to aggressive periodontitis: frequency and pure culture isolates. **J. Periodontol.**, v. 75, p. 592-599, 2004

YILMAZ, O.; SATER, A. A.; YAO, L.; KOUTOUZIS, T.; PETTENGILL, M.; OJCIUS, D. M. ATP-dependent activation of an inflammasome in primary gingival epithelial cells infected by *Porphyromonas gingivalis*. **Cell. Microbiol.**, v. 12, p. 188-198, 2010.

YUE, G.; KAPLAN, J. B.; FURGANG, D.; KEITH, G. M.; FINE, D. H. A second *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* autotransporter adhesion exhibits specificity for buccal epithelial cells in humans and old world primates. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 4440-4448, 2007

YUE, G., KAPLAN, J. B.; FINE, D. H. A motif in *aae* mediates binding to BECS and endothelium. **87th General Session and Exhibition of the IADR, Abst 1683. Miami.**, 2009.

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