

MAIKE PAULINO DA SILVA

**OMP29 de *Aggregatibacter
actinomycetemcomitans*: análise filogenética,
interação com proteínas de matriz e resposta de
células epiteliais**

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
2016

MAIKE PAULINO DA SILVA

**OMP29 de *Aggregatibacter
actinomycetemcomitans*: análise filogenética,
interação com proteínas de matriz e resposta de
células epiteliais**

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.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer

Versão original

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Maíke Paulino da.

OMP29 de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: análise filogenética, interação com proteínas de matriz e resposta de células epiteliais / Maíke Paulino da Silva. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Microbiologia oral.

Versão do título para o inglês: OMP29 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: phylogenetic analysis, interaction with matrix proteins and response of epithelial cells.

1. Bactérias gram-negativas 2. Proteínas de membrana externa I. Mayer, Profa. Dra. Marcia Pinto Alves II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB05/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS

Candidato(a): Maike Paulino da Silva.

Título da Dissertação: **OMP29 de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: análise filogenética, interação com proteínas de matriz e resposta de células epiteliais**

Orientador(a): Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 007 nas fls. 98 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Marcia Pinto Alves Mayer**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*Aggregatibacter actinomycetemcomitans: perfil de transcrição gênica de isolados clínicos e papel da resposta imune contra omp29 na indução da periodontite experimental em animais*" do qual participam o(s) alunos **Maíke Paulino da Silva** e a pesquisadora **Ellen Sayuri Ando**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)* em **28.02.2011, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 01 de março de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011)3091-7438
e-mail: cop@icb.usp.br

SOLICITAÇÃO DE RENOVAÇÃO DE PROTOCOLO - CEEA

Ao

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador da Comissão de Ética em Experimentação Animal

Solicito à Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICB/USP a renovação do protocolo nº nº007 nas fls. 98 do livro 02, aprovado em 01/03/2011, intitulado "*Aggregatibacter actinomycetemcomitans: perfil de transcrição gênica de isolados clínicos e papel da resposta imune contra omp29 na indução da periodontite experimental em animais*" sob minha responsabilidade.

Declaro que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas inicialmente para esta presente solicitação.

São Paulo, 30/01/2014

Prof. Dr. Marcia Pinto Alves Mayer
Coordenador da Linha de Pesquisa

CEUA - ICB/USP
RECEBIDO: 30/1/2014
Ass: Leonardo



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 004.14

São Paulo, 19 de fevereiro de 2014.

REF.: Protocolo nº 007/11.

"Aggregatibacter actinomycetemcomitans: perfil de transcrição gênica de isolados clínicos e papel da resposta imune contra omp29 na indução da periodontite"

Prezado Professor,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 21.02.17.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilma.Sra.
Profª Dra. Márcia Pinto Alves Mayer
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

A Irsemes Alves da Silva e Valdir Paulino da Silva, pessoas mais importantes da minha vida: meus pais, exemplos de amor, honestidade, dedicação, força, cumplicidade e humildade. Obrigado pelos ensinamentos e pela existência.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meus caminhos.

À minha orientadora Profa. Marcia Mayer, por ter aberto as portas do seu laboratório com tanto carinho, pelo incentivo constante, por ter transmitido seus conhecimentos e também pelos momentos descontraídos. Minha profunda admiração e gratidão.

À minha namorada Gardênia Márcia Silva Campos Mata, pelo incentivo, carinho, companherismo e ajuda nesta fase final do doutorado.

À minha família, tios, primos e avós e também aos amigos pelo incentivo constante.

À minha tia Neide por ter revisado a tese e também pelo carinho e incentivo permanente aos estudos..

À Universidade de São Paulo, ao Instituto de Ciências Biomédicas e ao departamento de Microbiologia, sempre com admiração e respeito.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido.

Aos meus amigos de laboratório Adriana, Bruno, Cintia, Dione, Ellen, Éricka, Glaucia, Josely, Karin, Lucas, Marcela, Mariana, Mouna, Natália, Pâmela, Paola, Priscila, Silvia, Talyta e Victor pela amizade e ajuda.

Aos técnicos de laboratório João Paulo e Leo por toda ajuda e apoio.

Ao Prof. Casey Chen por ter me recebido no seu laboratório e pelos valiosos ensinamentos que me transmitiu.

Ao Prof. Ramiro pela importante colaboração durante o estágio do doutorado no exterior e pela amizade.

Aos amigos que fiz durante minha estada na University of Southern California, Adriano, Dominik, Giusi, Jan, João Paulo, Juliana, Liza, Matthieu, Quyen, Samira, Silvana, Vitória, Viviam e Yohan pelo apoio e incentivo.

À todos os professores e colegas do departamento de Microbiologia pela ajuda e por compartilharem os bons momentos.

À secretaria de pós-graduação e ao comitê de ética pelo apoio.

Aos funcionários da biblioteca do ICB pela ajuda.

A todos que colaboraram e me ajudaram a realizar este trabalho.

Os meus sinceros agradecimentos!

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processos número: 2011/18683-1 e 2012/05911-9.

**“Gastei uma hora pensando um verso
que a pena não quer escrever.
No entanto ele está cá dentro
inquieta, vivo.
Ele está cá dentro
e não quer sair.
Mas a poesia deste momento
inunda minha vida inteira”.**

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

SILVA, M. P. **OMP29 de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: análise filogenética, interação com proteínas de matriz e resposta de células epiteliais.** 2016. 162 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

OMP29 é uma das principais proteínas de membrana externa de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e está associada à invasão de célula epitelial gengival (CEG). Os objetivos deste estudo foram: analisar filogeneticamente *omp29* em cepas de Aa; determinar a interação de OMP29 com proteínas de matriz extracelular e o efeito da sua interação com CEG, pela avaliação da expressão gênica. A análise filogenética permitiu identificar o gene parálogo a *omp29* codificado no cromossomo de Aa. Os genes *omp29* e *omp29^{par}* estão conservados em todas as cepas avaliadas. Variações foram observadas em *omp29* e *omp29^{par}*, bem como nos seus promotores e estas relacionam-se com os sorotipos. Foi obtida *Escherichia coli* recombinante em OMP29 e OMP29^{his} foi expressa e purificada e submetida à interação com as proteínas de matriz. OMP29^{his} interagiu com fibronectina plasmática e celular ($p < 0,05$), mas não com seus domínios F30 e 45 ou com colágenos I, III, IV e V, fibrinogênio, laminina e plasminogênio. Mutantes de Aa defectivos em *omp29* e/ou *omp29^{par}* (Aa Δ 29, Aa Δ 29P e Aa Δ 29P29) foram obtidas pelo sistema LoxP/Cre e co-cultivadas com CEG OBA-09, por 4 e 24 horas. CEG também foram submetidas à OMP29^{his} por 2, 6, 12 e 24 horas. A expressão gênica associada à resposta imediata foi determinada por PCR Array e 5 genes (*cd74*, *crp*, *faslg*, *tlr1* e *vcam1*) foram regulados negativamente e 16 genes (*bcl2*, *birc3*, *c3*, *casp3*, *ep300*, *fas*, *fosb*, *grb2*, *il-1 α* , *il-1 β* , *il-6*, *il-8*, *nr3c1*, *prkcq*, *socs3* e *tnfrsf1b*) foram regulados positivamente em CEG infectada com uma ou mais mutantes de Aa, em relação a cepa selvagem (controle). Dados obtidos por qRT-PCR indicaram regulação positiva quando CEG OBA-09 foi infectada com Aa Δ 29P29: *il-1 β* (770 X), *il-8* (21 X), *tnf* (11 X), *il-12 α* (10 X). A expressão de genes associados à resposta imune inata determinada após 24 horas de interação demonstrou regulação negativa de *il-8* na co-cultura com Aa Δ 29P e regulação negativa de *trl2* quando houve co-cultura com Aa Δ 29P e Aa Δ 29. Por outro lado, na co-cultura com Aa Δ 29P29 ocorreu regulação positiva de *il-1 β* e *il-8* ($p < 0,05$). A inoculação de OMP29^{his} em CEG OBA-09 promoveu regulação negativa de *il-8* e *il-6r*, e regulação positiva de *trl-2* e *il-18*. Os dados indicam ligação de OMP29^{his} à fibronectina celular e plasmática, e o envolvimento de OMP29 na resposta de células epiteliais induzida por Aa. A observação de que OMP29 interferiu na expressão de célula epitelial, indicam que OMP29 regula o processo inflamatório induzido pela microbiota e inibe a transcrição de genes associados à apoptose, um importante fator associado à sobrevivência de organismos intra-celulares. Assim, podemos concluir que OMP29 é um fator associado à evasão das defesas do hospedeiro de *A. actinomycetemcomitans*.

Palavras-chave: Proteína de membrana externa 29 (OMP29). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Doença periodontal.

ABSTRACT

SILVA, M. P. **OMP29 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: phylogenetic analysis, interaction with matrix proteins and response of epithelial cells.** 2016. 162 p. Ph. D. thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

OMP29 is one of the major outer membrane proteins of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) and is associated with invasion of gingival epithelial cell (CEG). This study aimed to evaluate phylogenetically *omp29* in Aa strains; determine the interaction of OMP29 with extracellular matrix proteins and its effect on GEC by gene expression analysis. Phylogenetic analysis allowed identifying *omp29* paralogue gene encoded in Aa chromosome. *omp29* and *omp29^{par}* genes are conserved in all Aa strains evaluated. Variations were observed for *omp29* and *omp29^{par}* as well as for their promoters and they were related to the serotypes. It was obtained *Escherichia coli* recombinant for OMP29 and OMP29^{his} was expressed and purified and subjected to interaction with matrix proteins. OMP29^{his} interacted with plasma and cellular fibronectin (p <0.05), but not to F30 and F45 domains, neither to collagens I, III, IV and V, fibrinogen, laminin and plasminogen. Mutants defective in *omp29* and/or *omp29^{par}* (AaΔ29, AaΔ29P and AaΔ29P29) were obtained by LoxP/Cre system and co-cultured with CEG OBA-09 for 4 and 24 hours. CEG was also subjected to OMP29^{his} for 2, 6, 12 and 24 hours. The gene expression associated with immediate response was determined by PCR Array and allowed the identification of 5 genes (*cd74*, *crp*, *faslg*, *tlr1* and *vcam1*) negatively regulated and 16 genes (*bcl2*, *birc3*, *c3*, *casp3*, *ep300*, *fas*, *fosb*, *grb2*, *il-1α*, *il-1β*, *il-6*, *il-8*, *nr3c1*, *prkcg*, *socs3* and *tnfrsf1b*) positively regulated in CEG infected with one or more Aa mutants, comparing to the wild type strain (control). Data obtained by qRT-PCR indicated positive regulation when CEG OBA-09 was infected with AaΔ29P29: *il-1β* (770 X), *il-8* (21 X), *tnf* (X-11), *il-12α* (10 X). The expression of genes associated with innate immune response was determined after 24 hours interaction demonstrated negative regulation of *il-8* when co-cultured with AaΔ29P and negative regulation of *tlr2* when co-cultured with AaΔ29P and AaΔ29. On the other hand, when there was co-culture with AaΔ29P29 occurred positive regulation of *il-1β* and *il-8* (p < 0.05). Inoculation of OMP29^{his} into CEG OBA-09 promoted negative regulation of *il-8* and *il-6r* in all, and positive regulation of *tlr-2*. *il-18*. The data indicate that OMP29^{his} binds to the cellular and plasma fibronectin, and the involvement of OMP29 in response to induced epithelial cells by Aa. The observation that OMP29 interfered with epithelial cell expression, shows that OMP29 regulates the inflammatory process induced by the microbiota and inhibits the gene transcription related to apoptosis, a factor significantly associated with survival of intra-cellular organisms. Thus, we can conclude that OMP29 is a factor related to evasion of *A. actinomycetemcomitans* host defenses.

Keywords: Outer membrane protein 29 (OMP29). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Periodontal disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Modelo esquemático da proteína OMPA na membrana externa de <i>Escherichia coli</i>	28
Figura 2- Representação esquemática dos sistemas de secreção de proteínas.....	29
Figura 3- Diagrama esquemático da modular, arquitetura multi-domínio de um heterodímero da fibronectina celular.....	36
Figura 4- Via de sinalização de FAS/FASL.....	43
Figura 5- Árvore filogenética de <i>A. actinomycetemcomitans</i> sorotipos a, b, c, d, e e f, baseada na análise das sequências do gene <i>omp29</i>	77
Figura 6- Árvore filogenética de <i>A. actinomycetemcomitans</i> sorotipos a, b, c, d, e e f, baseada na análise das sequências do gene <i>omp29^{par}</i>	78
Figura 7- Árvore filogenética de <i>A. actinomycetemcomitans</i> sorotipos a, b, c, d, e e f baseada no promotor (300 pb da jusante) do gene <i>omp29</i>	79
Figura 8- Árvore filogenética de <i>A. actinomycetemcomitans</i> sorotipos a, b, c, d, e e f, baseada no promotor (300 pb da jusante) do gene <i>omp29^{par}</i>	80
Figura 9- Análise de expressão relativa de <i>omp29</i> utilizando as cepas sorotipo a, b e C.....	81
Figura 10- Análise de expressão relativa de <i>omp29</i> utilizando as cepas sorotipo a, b e c individualmente. Cepas sorotipo a (707, C27-1 e C21-1).....	82
Figura 11- Fotografia do gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde produtos da reação de amplificação do gene <i>omp29</i> de <i>A. actinomycetemcomitans</i> HK1651.....	83
Figura 12- Fotografia do gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde produtos da reação de amplificação do gene <i>omp29</i> de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	83
Figura 13- Fotografia do gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde mostram os produtos da reação de digestão do vetor pTOPOomp29SPS.....	84
Figura 14- Fotografia do gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os plasmídeos extraídos foram submetidos à eletrorese, para verificação da presença do inserto.....	85
Figura 15- Fotografia do gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde produtos da reação de amplificação do gene <i>omp29</i>	85
Figura 16- Sequenciamento para confirmação do gene <i>omp29</i> no quadro de leitura do vetor pET28B. A sequência de nucleotídeos.....	86

Figura 17- Gel de poliacrilamida 10% SDS-Page de alíquota das culturas de <i>E. coli</i> recombinante, após a indução da expressão de OMP29 ^{his}	87
Figura 18- Dados de D.O. _{490nm} em ensaio de ELISA 21 dias após imunização primária.....	88
Figura 19- Dados de D.O. _{490nm} em ensaio de ELISA 42 dias após imunização primária e reforço de 50 µg ao 21 ^o dia.....	88
Figura 20- Dados de D.O. _{490nm} em ensaio de ELISA 63 dias após imunização primária e reforço de 50 µg ao 42 ^o dia.....	88
Figura 21- Gel de poliacrilamida 10% SDS- Page de alíquota da proteína recombinante OMP29 ^{his} . (1) Detecção de OMP29 ^{his} usando soro policlonal Anti-OMP29 ^{his} por meio de <i>Western blot</i> . (2) Detecção de OMP29 ^{his} usando soro do indivíduo com periodontite agressiva localizada.....	89
Figura 22- Dados de D.O. _{490nm} em ensaio de ELISA para análise da interação de OMP29 ^{his} com as proteínas de matriz.....	90
Figura 23- Fotografia do gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde produtos de PCR usando como molde DNA extraído da cepa selvagem e das mutantes finais AaΔ29 e AaΔ29P.....	91
Figura 24- Sequenciamento para confirmação da mutante final AaΔ29 e AaΔ29P.....	92
Figura 25- Fotografia do gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde produtos de PCR da mutante com deleção em <i>omp29</i> e <i>omp29^{par}</i> foram submetidos à eletroforese.....	93
Figura 26- Sequenciamento para confirmação da mutante AaΔ29P29. A sequência de nucleotídeos mostra em verde o fragmento localizado a montante.....	93
Figura 27- Sequenciamento para confirmação da mutante AaΔ29P29. (A) A sequência de nucleotídeos mostra, em verde, o fragmento localizado a jusante.....	94
Figura 28- Fotografia de Gel de poliacrilamida 10%SDS-PAGE, onde alíquotas de membrana externa isoladas de culturas das mutantes de <i>A. actinomycetemcomitans</i> defectivas em <i>omp29</i> e <i>omp29^{par}</i> e de cepa selvagem AaD7S (D7S-1).....	95
Figura 29- (A) Gel de poliacrilamida 10%SDS-Page, onde de alíquota da proteína recombinante OMP29 ^{his} e membrana externa isolada de culturas das mutantes de <i>A. actinomycetemcomitans</i> (AaΔ29, AaΔ29P e AaΔ29P29) e da cepa selvagem (AaD7S).....	96
Figura 30- Fotografias de gel de agarose (1%) em tampão TAE. (A) produtos da digestão do vetor pKM2/ltxP e dos vetores TOPO ligado a <i>omp29</i> e a <i>omp29^{par}</i>	97

Figura 31- Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE. (A) Produtos de PCR da mutante de <i>A. actinomycetemcomitans</i> AaΔ29 complementadas.....	98
Figura 32- Gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE, onde alíquotas de célula inteira de <i>A. actinomycetemcomitans</i> defectiva em <i>omp29</i> e/ou <i>omp29^{par}</i> e seus isolados complementados, e o isolado do tipo selvagem (AaD7S).....	98
Figura 33- Curva de crescimento de cepas de <i>A. actinomycetemcomitans</i> defectivas em <i>omp29</i> e/ou <i>omp29^{par}</i>	99
Figura 34- Análise da expressão relativa por qRT-PCR em ensaio de co-cultura por 4 horas entre célula epitelial gengival (OBA-09) e <i>A. actinomycetemcomitans</i> selvagem (AaD7S) e suas respectivas mutantes com deleção na <i>omp29</i> e <i>omp29^{par}</i>	104
Figura 35- Análise da expressão relativa por qRT-PCR em ensaio de co-cultura por 24 horas entre célula epitelial gengival (OBA-09) e <i>A. actinomycetemcomitans</i> selvagem (AaD7S) e suas respectivas mutantes com deleção na <i>omp29</i> e <i>omp29^{par}</i>	106
Figura 36- Análise da expressão relativa por qRT-PCR em ensaio de interação entre célula epitelial gengival (OBA-09) e OMP29 ^{his}	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Plasmídeos usados neste estudo.....	52
Tabela 2- Cepas de <i>A. actinomycetemcomitans</i> usados na análise filogenética.....	54
Tabela 3- Oligonucleotídeos para amplificação do gene <i>omp29</i> e tamanho dos produtos da reação.....	58
Tabela 4- Lista de iniciadores usados para construção e complementação das mutantes de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	66
Tabela 5- Efeito da interação entre célula epitelial (OBA-09) e <i>A. actinomycetemcomitans</i> (AaD7S, Aa Δ 29, Aa Δ 29P, Aa Δ 29P29) na expressão relativa de genes associados à inflamação imediata após 4 horas de incubação.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%- Porcentagem

°- grau

AaD7S- Cepa de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* selvagem D7S-1

AaΔ29- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* defectiva em *omp29*

AaΔ29P29- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* defectiva em *omp29* e em *omp29* parálogo.

AaΔP29- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* defectiva em *omp29* parálogo

AICD- Activation-induced cell death/ Morte celular induzida por ativação

Akt- *Protein Kinase B*/ Proteína quinase B

Amp- Ampicilina

AP1- *Activating protein-1*/ Ativação da proteína 1

APAF-1- *Apoptotic protease-activating factor 1*/ Protease ativadora do fator 1

APCs- *Antigen-presenting cell*/ Células apresentadoras de antígeno

ApiA- Proteína de membrana externa de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, conhecida como OMP100

ASC- Caspase recruitment domain/ Domínio de recrutamento de caspase

BAK- *BCL-2 antagonist killer*/ Assassino 1 antagonista de BCL-2

BAX- *BCL-2 associated X protein*/ Proteína X associada ao BCL-2

BCL-2- *B-cell lymphoma 2*/ Célula-B de linfoma 2

BID- *BH3-interacting domain death agonist*/ Agonista de morte que interage com o domínio BH3

birc 3- baculoviral IAP repeat-containing protein 3 gene/ gene bucolovírus IAP contendo repetições de proteína 3

C- Celsius

c-DNA- *Complementary desoxyribonucleic acid*/ Ácido desoxirribonucleico complementar

C3- *Complement componente 3*/ Componente 3 do complemento

CAM- Complexo de ataque a membrana

casp- gene que codifica Caspase

CBP- CREB-binding protein/ Proteína de ligação à CREB

CCR- *C-C chemokine receptor*/ Receptores de quimiocina C

CD- *Cluster of differentiation*/ Agrupamento de diferenciação

CDT- *Cytolethal distending toxin*/Toxina citoletal distensora

CEGH- Células epiteliais gengivais humanas

Células OBA- Linhagem de célula epitelial normal gengival imortalizada

Células Th- *T helper cells*/Células T auxiliares

Cm- Cloranfenicol

COX- Cyclo-oxygenase/ Ciclo-oxigenases

CT- *Cycle Threshold*/ Limiar de ciclo

CXCR- *Chemokine receptor*/ Receptor de quimiocina

D.O.- Densidade óptica

DAMPs- *Damage-associated molecular pattern molecules*/ Padrões moleculares associados a perigo

DC- *Dendritic cell*/ Célula dendrítica

DED- *Death-effector domain*/ Domínio efetor de morte

DISC- *death inducing signalling complex*/ Complexo indutor de sinalização de apoptose

DNA- Desoxyribonucleic acid/ Ácido desoxirribonucleico

dNTP- Desoxirribonucleotídeos trifosfato
E3- *Ubiquitin E3 ligase complex*/ Complexo de E3 ligase
EDTA- *Ethylenediamine tetraacetic acid*/ Ácido etilenodiamino tetra- acético
EGFR- *Epidermal growth factor receptor*/ Receptor do fator de crescimento epidérmico
ELISA- *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*/ Ensaio imunoenzimático
EmaA- Proteína de membrana externa de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
EP300- *E1A binding protein p300*/ E1A associado à proteína p300
ERK- *Extracellular-signal-regulated kinases*/ Quinase regulada por sinal extracelular
F- iniciador direto
FADD- *FAS-associated death domain*/ Domínio de morte associada ao receptor FAS
FAK- *Focal Adhesion Kinase*/ Quinase de adesão focal
FAS- *FAS Receptor*/ Receptor FAS
FASL- *FAS ligand*/ Ligante FAS
Fn- Domínio de ligação à fibronectina
FnBPs- *Fibronectin-binding proteins*/ Proteínas bacterianas ligantes de fibronectina
FNIII- Fragmento do primeiro módulo da fibronectina
fosb- *FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B*/ Oncogene viral de Osteosarcoma murínico FBJ homólogo B
g- Gravidade
gapdh- *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene*/ Gene gliceraldeído-3-fofato desidrogenase
GBD- Gelatin-binding domain/ Domínio de ligação à gelatina
GC- gengivite crônica
GCP-2- *Granulocyte chemotactic protein-2*/ Proteína quimiotática de granulócitos 2
Gene ID- Identidade do gene
GM-CSF- *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*/ Fator de estimulação de colônia de granulócitos e macrófago.
GPCRs- *G protein-coupled receptors*/ receptores acoplados à proteína G
GRB2- *Growth factor receptor-bound protein 2*/ Proteína ligada ao receptor do fator de crescimento 2
HBD- Heparin-binding domain/ Domínio de ligação à heparina
HGEC- Human gingival epitelial cultre/ Cultura de célula epitelial humana
IAP- *Inhibitor of apoptosis proteins*/ Proteínas inibidoras de apoptose
IFN- Interferon
Ig- Imunoglobulina
IL- interleucina
IPTG- Isopropil β -D-tiogalactoside
I κ B α - *Inhibitor of kappa B*/ Proteína inibitória do fator nuclear kappa B
JNK- *c-Jun N-terminal kinase*/ Quinase N-terminal c-Jun
JP2-like- Cepas do clone JP2
kDa- Kilodalton
Kn- Canamicina
LB- Luria-Bertani
LFA-1- *Integrin lymphocyte function-associated antigen-1*/ Integrina de linfócito associada ao antígeno 1
LPS- Lipopolissacarídeo
LTX- Leucotoxina
M- Molar

M-CSF- *Macrophage colony-stimulating factor*/ Fator de estimulação de colônia de macrófago.

MAPK- *Mitogen-activated protein kinases*/ Proteína quinase ativadas por mitógenos

MHC- *Major histocompatibility complex*/ Complexo principal de histocompatibilidade

MIF- *Macrophage migration inhibitory factor*/ Fator de inibição de macrófagos

mL- Mililitro

MLEE- *Multilocus nzyme electrophoresis*/ Eletroforese de enzimas multilocus

MLST- *Multilocus sequece typing*/ Tipagem de sequência multilocus

mM- Milimolar

MMP- Metaloproteinase

MOI- *Multiplicity of infection*/ Multiplicidade de infecção

N- Normalidade

NAP-2- *Neutrophil-activating peptide-2*/ Peptídeo de ativação de neutrófilo

NF- κ B- *Factor nuclear kappa B*/ Fator nuclear kappa B

NFATc-1- *Nuclear factor of activated T-cells, Cytoplasmic, Calcineurin-Dependent 1*/ Fator nuclear de ativação de células T, citoplasmático, dependente de calcineurina 1

ng- Nanograma

NLR- *Nucleotide-binding oligomerization domain receptor*/ Receptor de ligação à nucleotídeo-ligante

nm- Nanômetro

NOD- *Nucleotide-binding oligomerization domain*/ Domínio de oligomerização de nucleotídeo

NR3C1 - *Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1*/ Receptor nuclear sub-família 3, grupo C, membro 1

OMP- Outer membrane protein/ Proteína de membrana externa

OMP29^{his}- *Outer membrane protein 29 histidine*/ Proteína de membrana externa 29 recombinante com cauda de histidina

omp29^{par}- gene *omp29* parálogo

OMPA-like- Proteínas de membrana externa da família OMPA

OPD- o-phenylenediamine

PAG- Periodontite agressiva generalizada

PAL- Periodontite agressiva localizada

PAMPs- *Pathogen-associated molecular patterns*/ Padrões moleculares associados a patógenos

pb- Pares de base

PBS- *Phosphate buffered saline*/ Solução salina tamponada fosfatada

PC- Periodontite crônica

PCR- *C-reactive protein*/ Proteína C-reativa

PCR- *Polymerase chain reaction*/ Reação da cadeia de polimerase

pECM- *Extracellular matrix proteins*/ Proteínas da matriz extracelular

PFGE- *Pulsed-field gel electrophoresis*/ Eletroforese em gel de campo pulsado

PGE2- *Prostaglandin E2*/ Prostaglandina E2

PGH2- *Prostaglandin H2*/ Prostaglandina H2

PI3K- *Phosphatidylinositol 3-kinase*/ Fosfatidilinositol 3-quinase

PKC- *Protein kinase C*/ Proteína quinase C

PM- Peso molecular

pmoles- Picomoles

PMSF- Fenilmetilsulfonilflúor

PRKCC- *Protein kinase C-theta*/ Proteínas quinase C-theta

PRRs- *Pattern recognition receptors*/ Receptores de reconhecimento de padrão

PS- Periodonto saudável
ptgs2- Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 gene / gene prostaglandina-endoperoxido sintase 2
PTK- *Protein tyrosine kinases/ Proteína tirosina quinase*
qRT *Quantitative reverse transcription/ Transcrição reversa quantitativa*
R- Reverso
RANKL- *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand/ Ligante do receptor do fator nuclear kappa-B*
RIPK- *Receptor-interacting protein kinases/ Proteína quinase de interação com o receptor*
RNA- *Ribonucleic acid/ Ácido ribonucléico*
rpm- rotação por minuto
RTK- *Receptor tyrosine kinases/ Receptor tirosina quinase*
SDS- Dodecil sulfato de sódio
SOCS- *Suppressors of cytokine signaling protein/ Proteína associada à supressão de sinalização de citocina*
SOS- Son of sevenless homolog 1
Spec- Espectinomicina
STAT- *Signal transducers and activators of transcription protein/ Proteína ativadora de transcrição e transdutora de sinalização*
T2SS- *Type 2 secretion system/ Sistema de secreção tipo II*
TAE- *Tris-acetate-EDTA/ Tris-acetato-EDTA*
tBID- *Truncated BID/ BID truncado*
TBS-T- *Tris-Buffered Saline and Tween 20/ Solução salina tamponada com Tris e Tween 20*
Tc- Tetraciclina
TCR- *T cell receptor/ Receptor de célula T*
TNF- Tumor necrosis factor/ Fator de necrose tumoral
tnfrsf1b- Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 1B gene/ Gene da superfamília de receptores de fator de necrose tumoral, membro 1
Tp0483- Proteína de membrana externa de *Treponema pallidum*
TRL- *Toll-like receptor/ Receptor T da família toll*
TSBYE- Meio triptone soja acrescido de extrato de levedura
U- Unidade
UFC- Unidade formadora de colônia
VCAM-1- *Vascular cell adhesion protein 1/ Molécula de adesão celular vascular-1*
VLA4- *Very Late Antigen 4/ Antígeno 4 tardio (integrina)*
VompC- Proteína de membrana externa de *Bartonella Quintana*
YadA- Adesinas autotransportadas de *Yersinia*
A- Alfa
β- Beta
γ- Gama
μg- Micrograma
μL- Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 MATERIAIS E MÉTODOS	51
2.1 Cepas bacterianas, plasmídeos e condições de crescimento	51
2.1.1 <i>Condições gerais de crescimento de A. actinomycetemcomitans</i>	51
2.1.1.1 Condições de crescimento para determinação dos níveis de transcrição relativa de <i>omp29</i> em diferentes cepas de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	51
2.1.1.2 Cepas bacterianas e plasmídeos para obtenção e complementação das mutantes de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	51
2.1.2 <i>Condições gerais de crescimento de Escherichia coli</i>	52
2.2 Análise filogenética baseada nas sequências de <i>omp29</i> e <i>omp29^{par}</i> e da região promotora	52
2.3 Determinação dos níveis de transcrição relativa de <i>omp29</i> em diferentes cepas de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	55
2.3.1 <i>Extração de RNA</i>	55
2.3.2 <i>Síntese de cDNA e PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)</i>	55
2.4 Obtenção de OMP29 recombinante	57
2.4.1 <i>Obtenção de E. coli recombinante em omp29</i>	57
2.4.2 <i>Expressão e purificação da proteína recombinante (OMP29^{his})</i>	59
2.5 Obtenção do soro murínico policlonal anti-OMP29	60
2.5.1 <i>Análise dos títulos de anticorpos IgG anti-OMP29</i>	61
2.6 Reconhecimento de OMP29^{his} pelo soro murínico anti-OMP29^{his} e soro de indivíduo com periodontite agressiva localizada	62
2.6.1 <i>Western blot</i>	62
2.7 Interação da proteína recombinante OMP29^{his} com proteínas de matriz extracelular (pECM)	63
2.8 Obtenção das mutantes de <i>A. actinomycetemcomitans</i> defectivas em <i>omp29</i> e <i>omp29^{par}</i>	64
2.8.1 <i>Manipulação de DNA</i>	64
2.8.2 <i>Deleção do gene sítio-específico com o sistema loxP/Cre</i>	64
2.8.3 <i>Determinação da expressão das proteínas OMP29 e OMP29^{par} nas mutantes</i>	67
2.8.3.1 <i>Isolamento de membrana externa</i>	67

2.8.3.2	Análise proteômica por meio de espectrometria de massa.....	68
2.8.3.3	Curva de crescimento de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	69
2.8.3.4	Determinação da produção de OMP29 no extrato de membrana externa de <i>A. actinomycetemcomitans</i> por <i>Western Blot</i>	69
2.8.3.5	Complementação das mutantes AaΔ29 e AaΔP29.....	70
2.9	Interação de OMP29^{his} e de mutantes de <i>A. actinomycetemcomitans</i> defectivas em <i>omp29</i> e/ou <i>omp29^{par}</i> com célula epitelial gengival.....	70
2.9.1	<i>Cultura primária e linhagem de célula epitelial gengival humana imortalizada</i>	70
2.9.2	<i>Ensaio de Interação bacteriana</i>	71
2.9.2.1	<i>Interação bacteriana em linhagem de célula epitelial gengival após 4 horas por PCR Array</i>	72
2.9.2.2	<i>Interação bacteriana em linhagem de célula epitelial gengival após 4 horas por qRT-PCR</i>	73
2.9.2.3	<i>Interação bacteriana em linhagem de célula epitelial gengival após 24 horas por qRT-PCR</i>	73
2.9.3	<i>Interação da proteína recombinante OMP29^{his} com célula epitelial gengival (OBA-09) por qRT-PCR</i>	74
3	RESULTADOS	75
3.1	Análise filogenética baseada nas sequências de <i>omp29</i> e <i>omp29^{par}</i> e da região promotora	75
3.1.1	<i>Análise filogenética baseada nas sequências de <i>omp29</i> e <i>omp29^{par}</i></i>	76
3.1.2	<i>Análise filogenética baseada na sequência da região promotora <i>omp29</i> e <i>omp29^{par}</i></i>	76
3.2	Determinação dos níveis de transcrição relativa de <i>omp29</i> em diferentes cepas de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	81
3.3	Obtenção de OMP29 recombinante	82
3.4	Obtenção de soro murínico policlonal anti-OMP29	87
3.4.1	<i>Reconhecimento de OMP29^{his} pelo soro murínico anti-OMP29^{his} e soro de indivíduo com periodontite agressiva localizada</i>	89
3.5	Interação da proteína recombinante OMP29^{his} com proteínas da matriz extracelular (pECM)	89
3.6	Obtenção das mutantes de <i>A. actinomycetemcomitans</i> defectivas em <i>omp29</i> e <i>omp29^{par}</i>	91

3.6.1 Complementação dos genes deletados.....	96
3.7 Interação de OMP29^{his} e de mutantes de <i>A. actinomycetemcomitans</i> defectivas em <i>omp29</i> e/ou <i>omp29^{par}</i> com célula epitelial gengival.....	99
3.7.1 Curva de crescimento de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	99
3.7.2 Interação bacteriana em linhagem de célula epitelial gengival após 4 horas por PCR Array.....	100
3.7.3 Interação bacteriana em linhagem de célula epitelial gengival após 24 horas por qRT-PCR.....	103
3.7.4 Interação bacteriana em linhagem de célula epitelial gengival após 24 horas por qRT-PCR.....	105
3.7.5 Interação da proteína recombinante OMP29 ^{his} com célula epitelial gengival (OBA-09) por qRT-PCR.....	107
4 DISCUSSÃO.....	109
5 CONCLUSÃO.....	127
REFERÊNCIAS*.....	129

1 INTRODUÇÃO

A periodontite corresponde a uma inflamação e destruição dos tecidos periodontais em resposta aos micro-organismos específicos presentes no biofilme bucal (HAFFAJEE et al., 1994; LÖE et al., 1965; LISTGARTEN et al., 1978; LOESCHE et al., 1985; SOCRANSKY, 1970; SOCRANSKY et al., 1998; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1994).

Os patógenos associados à periodontite estão frequentemente presentes na microbiota subgingival humana e são representados principalmente por bactérias anaeróbias Gram-negativas (MINTZ, 2004). *Aggregatibacter* (anteriormente, *Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*, da família *Pasteurellaceae*, é um cocobacilo, fermentativo, Gram-negativo e capnófilico, não móvel e não esporulado, considerado o principal agente etiológico das lesões de periodontite agressiva localizada, mas também associado à periodontite crônica (CORTELLI et al., 2005, 2009; DA SILVA-BOGHOSSIAN et al., 2011; GAFAN et al., 2004; HARASZTHY et al., 2000; RACKIC et al., 2010; SLOTS et al., 1980; YANG et al., 2005; ZAMBON et al., 1983), embora possa ser encontrado em indivíduos com periodonto saudável (FAVERI et al., 2009). Infecções extra-orais podem estar associadas com *A. actinomycetemcomitans*, como endocardites infecciosas, bacteremia, septicemia, meningite, pneumonia, osteomielite, infecções do trato urinário, abscessos e ateroma (HENDERSON et al., 2003; MAEDA et al., 2009; MUHLE et al., 1979; PAGE; KING, 1966; PATUREL et al., 2004; WESTLING; VONDRACEK, 2008).

A associação com a doença é dependente da virulência do micro-organismo e da susceptibilidade do hospedeiro (FINE et al., 2006). *A. actinomycetemcomitans* possui diversos fatores de virulência que contribuem para a sua patogenicidade na doença periodontal (WILSON; HENDERSON, 1995). A leucotoxina (LTX), toxina citoletal distensora (*Cytolethal distending toxin*, CDT), bacteriocinas, adesinas e lipopolissacarídeo (LPS) (HENDERSON et al., 2003) correspondem à variedade de fatores de virulência de *A. actinomycetemcomitans* que parecem estar associados à patogênese da periodontite agressiva localizada. Macromoléculas como adesinas (TANG; MINTZ, 2010) e receptores específicos da superfície da célula hospedeira, como transferrinas e integrinas (receptores secundários), medeiam a adesão de *A. actinomycetemcomitans* ao tecido epitelial (HENDERSON et al., 2003; MINTZ; FIVES-TAYLOR, 1994). As fimbrias de *A. actinomycetemcomitans* são compostas

por subunidades repetidas de proteínas Flp1 de 6,5 kDa, e responsáveis pela formação de agregação às outras bactérias e adesão às superfícies abióticas (KAPLAN, 2001).

As proteínas de membrana externa (*Outer membrane proteins*, OMPs), são altamente conservadas ao longo da evolução e presentes na membrana externa de bactérias Gram-negativas. Sintetizadas no citoplasma, estas proteínas são translocadas através da membrana interna e, provavelmente, difundidas pelo periplasma antes de sua inserção na membrana externa. Diversas mudanças conformacionais, decorrentes da passagem através do periplasma, possibilitam a inserção na membrana externa devido à sua natureza hidrofóbica (MOGENSEN; OTZE, 2005). Diferentes OMPs de *A. actinomycetemcomitans* são homólogas a fatores de virulência de outros patógenos e atuam na adesão, invasão, além de outras funções com receptores para bacteriófagos, atividade de porinas, resistência ao soro, mediadores da conjugação, além de promoverem a estabilização da membrana externa (ASAKAWA et al., 2003) e fatores envolvendo resistência à opsonização e morte (SANDT; HILL, 2000) em espécies de *Neisseria*, *Yersinia*, *Escherichia coli* e outras. Entre as proteínas da membrana externa de *A. actinomycetemcomitans*, destacam-se seis (OMP100, OMP64, OMP39, OMP29, OMP16 e OMP18) que podem ser reconhecidas por anticorpos no soro de pacientes com periodontite agressiva (KOMATSUZAWA et al., 2002).

A proteína termo-modificável de membrana externa OMP29 é umas das principais proteínas de membrana externa de *A. actinomycetemcomitans* e homóloga à OMPA, a qual tem sido identificada em várias bactérias Gram-negativas (KOMATSUZAWA et al., 2002, 1999). A família das proteínas de membrana externa OMPA é um grupo geneticamente relacionado. Foi observado que OMP29 de *A. actinomycetemcomitans* apresenta significativa homologia com a porção N-terminal de OMPA de outras bactérias Gram-negativas (WILSON et al., 1991a), que estão em alto número de cópias na membrana externa, principalmente de bactérias Gram-negativas. A família da proteína OMPA está associada à virulência, entretanto há resultados conflitantes sobre o papel protetor dos anticorpos contra esta família. Em bovinos vacinados com OMPs de *Pasteurella multocida*, altos títulos de anticorpos séricos estão associados à resistência ao desafio experimental (DABO et al., 2008). No entanto, em um modelo com camundongos, foi demonstrado que OMPA (homóloga a OMP29 de *A. actinomycetemcomitans*) pode atuar como um inibidor

competitivo de reconhecimento contra os antígenos protetores, já que a adição de rPmOmpA à vacina promoveu um efeito adverso significativo (DABO et al., 2008).

OMPA de *Klebsiella pneumoniae* é um atenuador da resposta das células das vias aéreas. Esta proteína promove evasão imune facilitando a sobrevivência do patógeno no ambiente hostil do pulmão (MARCH et al., 2011). A infecção de monócitos com a cepa selvagem de *Escherichia coli* K1, a qual provoca meningite em recém-nascidos, suprime a produção de citocinas e quimiocinas (TNF- α , célula T normal expressa e segregada, proteína inflamatória de macrófagos 1 β , IL-1 β , e IL-8). Já a mutante defectiva em OMPA, resultou em uma produção robusta de citocinas e quimiocinas. A cepa selvagem de *E. coli* K1 impediu a fosforilação e a degradação do inibidor de κ B, bloqueando, assim, a translocação do fator nuclear (NF)- κ B para o núcleo (SELVARAJ; PRASARADAO, 2005).

As proteínas de membrana externa desempenham um papel central na manutenção da estrutura da membrana (KLEINSCHMIDT, 2006) e também formam uma porina permeável a íons, a qual é controlada por um mecanismo de entrada eletrostática influenciada por sal, que permite a sobrevivência bacteriana durante o estresse osmótico (HONG et al., 2006). OMPA é abundante na membrana, com estimativa de aproximadamente 100.000 cópias por célula de *E. coli* (KOEBNIK et al., 2000). A expressão de proteínas OMPA-like, em algumas bactérias, é influenciada pelo seu ambiente externo, com o aumento da expressão sob condições, tais como: cultura anaeróbica, a escassez de nitrogênio e exposição à poliamina. Por outro lado, a diminuição da expressão ocorre durante o desafio ácido e exposição à peptídeos antimicrobianos (SMITH et al., 2007a). Um estudo em nosso laboratório indicou regulação da expressão de virulência por condições ambientais, já que a expressão do gene *omp29* é dependente da fase da cultura bacteriana (LONGO, 2008). Em estudo com 3 cepas de referência, pudemos observar que as amostras sorotipo b JP2 e SUNY 467 (não JP2-like) produzem altos níveis de transcritos do gene *omp29*, enquanto a amostra 29523, sorotipo a, não apresentou níveis detectáveis de transcritos de *omp29* em nenhuma das condições testadas (UMEDA, 2010). Assim é possível que mesmo os isolados de *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b que colonizam estes indivíduos analisados apresentem expressão diferencial destas OMPs.

Foi claramente demonstrado que OMP29 de *A. actinomycetemcomitans* tinha uma identidade significativa com membros da família de proteínas OMPA (WILSON

et al., 1991a). A OMP identificada mais próxima de OMP29 é a proteína da membrana externa P5 (OMPP5) de *Haemophilus influenzae* (MUNSON et al., 1993). Estas duas proteínas têm 67% de identidade. OMP29 também demonstra 52,9% de identidade com OMPAs de *E. coli* e *Salmonella Typhimurium* (BECK et al., 1980, FREUD et al., 1983). OMP29 apresenta 57,1 e 56,7% de identidade com as duas proteínas homólogas de OMPA, MOMP e OMPA2, de *Haemophilus ducreyi*, respectivamente (KLESNEY-TAIT et al., 1997). Assim como, *A. actinomycetemcomitans*, *H. ducreyi* (KLESNEY-TAIT et al., 1997) e *Aeromonas salmonicida* (COSTELLO et al., 1996) também apresentam genes que codificam OMPs homólogas à OMPA.

Pouco se sabe sobre a função de OMP29 de *A. actinomycetemcomitans*, mas provavelmente compartilha as características descritas acima, já que é OMPA-like. Até o momento, OMP29 de *A. actinomycetemcomitans*, se liga à porção Fc de IgG, que pode inibir a ativação do complemento no hospedeiro (MINTZ; FIVES-TAYLOR, 1994). OMP29 está associada com a entrada de *A. actinomycetemcomitans* em células epiteliais gengivais devido ao aumento da regulação do rearranjo da actina F por meio da via de sinalização FAK (KAJIYA et al., 2011). A transferência de células Th1 OMP29 específica, ao redor da injeção gengival local com OMP29, parece ser um gatilho para a reabsorção óssea (KAWAI et al., 2012). Além disso, induz a produção de interleucina IL-8 em culturas de célula gengival epitelial humana (KISHIMOTO et al., 2008; UCHIDA et al., 2005).

Embora a estrutura da proteína OMP29 de *A. actinomycetemcomitans* ainda não tenha sido completamente descrita, como é da família OMPA, podemos supor que possuam características semelhantes. OMPA é caracterizada por um domínio N-terminal que forma um barril beta com uma fita de 8 cadeias antiparalela, inserida na membrana externa. O domínio C-terminal é globular e está localizado no espaço periplasmático (CONFER et al., 2012). Quando a região N-terminal da molécula de OMPA de *E. coli*, atravessa a membrana externa oito vezes, formam-se quatro alças curtas na superfície bacteriana (Figura 1) (KLOSE et al., 1988, MORONA et al., 1984; VOGEL et al., 1986). Essas alças servem como receptores para vários bacteriófagos específicos para a OMPA (VAN ALPHEN et al., 1977). A incorporação da proteína à membrana externa resulta em uma conformação que gera um receptor de fago. Observou-se que quando OMPA é desnaturada, não se liga aos fagos, entretanto quando complexada com lipopolissacarídeo, um componente principal da

membrana externa, adquire a capacidade de ligação à fago (DATTA et al., 1977). O domínio C terminal de OMPA é hidrofílico e localizado no espaço periplasmático (Figura 1) (KLOSE et al., 1988; MORONA et al., 1984; VOGEL et al., 1986), o qual não é essencial para a localização de OMPA na membrana externa ou para a sua função de receptor de fago (BREMER et al., 1982). Foi demonstrado que o domínio N-terminal de OMPA de *E. coli* é um imunógeno fraco, já que deu origem a títulos significativamente mais baixos de anticorpo anti-OMPA do que quando comparado com preparados de OMPA completo. Portanto, o domínio periplasmático C-terminal parece ser um epítipo imunodominante da proteína OMPA purificada. Resultados semelhantes foram obtidos com o OMPA de *Salmonella Typhimurium* (PUOHINIEMI et al., 1990).

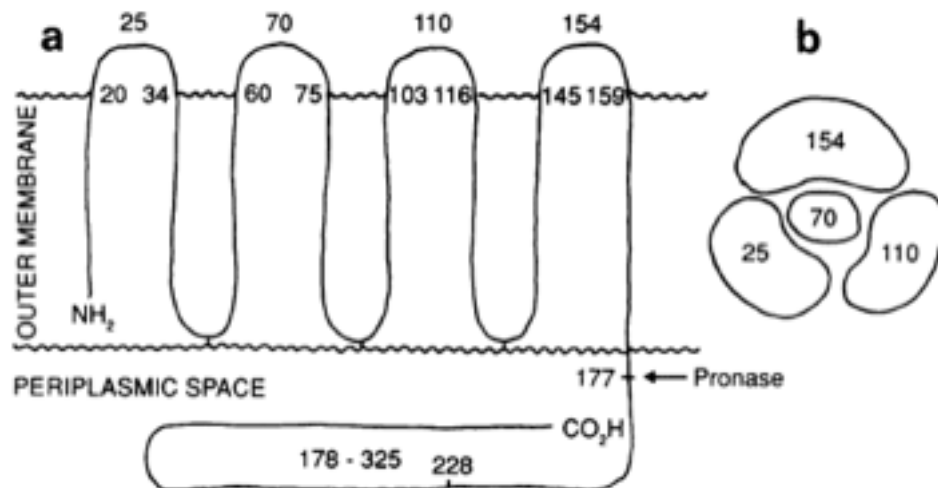


Figura 1- Modelo esquemático da proteína OMPA na membrana externa de *Escherichia coli*. Na vista bidimensional (a), as regiões expostas são designadas por números de resíduos de aminoácidos. O sítio de clivagem pronase é mostrado no trecho da transição entre a membrana incorporada e o espaço periplasmático da proteína. (b) mostra a proteína OMPA vista do exterior da célula. **Fonte:** PUOHINIEMI et al., 1990.

A proteína OMP29 é secretada usando o sistema de secreção geral, sistema de secreção Tipo II (*Type 2 secretion system, T2SS*), que utiliza o translocón Sec para o transporte através da membrana interna (HENDERSON et al., 2004; TANG et al., 2012) (Figura 2).

Os isolados de *A. actinomycetemcomitans* são classificados em seis sorotipos, de a a f (ASIKAINEN et al., 1991; KAPLAN et al., 2001; SAARELA et al.,

1992), determinados pelo polissacarídeo do LPS (KAPLAN et al., 2001; SAARELA et al., 1992; ZAMBON et al., 1983). Na cavidade bucal, os sorotipos mais frequentes são a, b, c, e f (NAKANO et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2006; YANG et al., 2005) sendo que o sorotipo b é o mais frequentemente associado à periodontite agressiva (ASIKAINEN et al., 1991; KIM et al., 2009; SAARELA et al., 1992; ZAMBON et al., 1983). Entretanto, há diferenças na distribuição dos sorotipos entre as populações africanas, asiáticas, européia e norte e sul americanas (ASIKAINEN et al., 1991; HAUBEK et al., 1996; KIM et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2006; TINOCO et al., 1997; YANG et al., 2005). Dados obtidos no Brasil revelaram que além do sorotipo b, o sorotipo c foi também associado à periodontite agressiva (KAWAMOTO et al., 2009; PINHEIRO et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2006), como ocorre também na Alemanha, enquanto na Coreia predominam os sorotipos c e d (KIM et al., 2009).

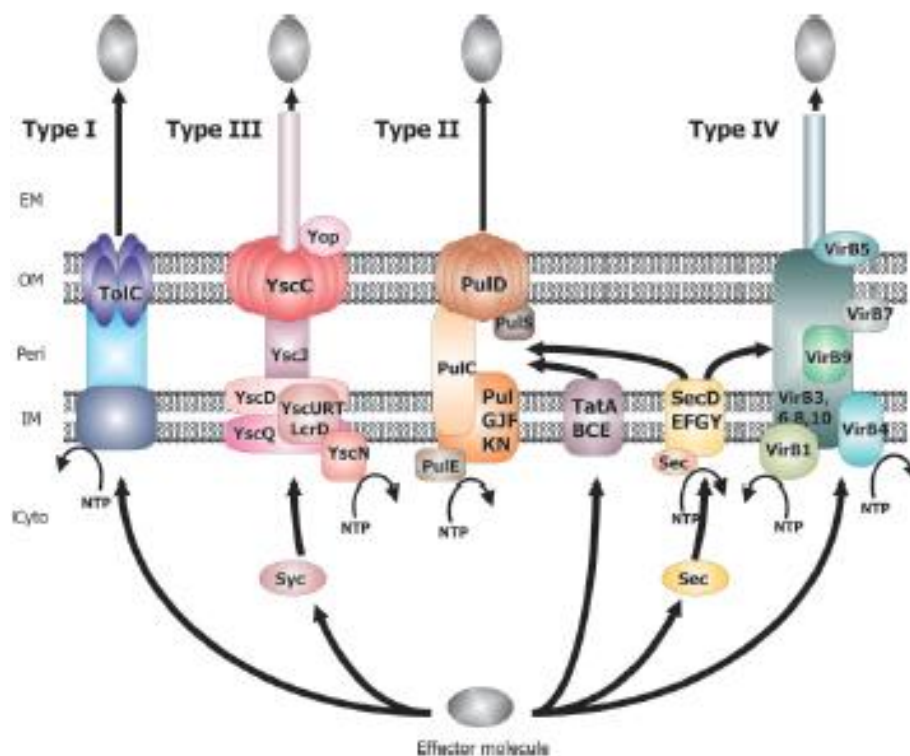


Figura 2- Representação esquemática dos sistemas de secreção de proteínas do tipo I, II, III e IV. O sistema do tipo II é exemplificado por secreção pululanase em *Klebsiella oxytoca*. O tipo II e em alguns casos, os sistemas de secreção do tipo IV utilizam a chaperona SecB citoplasmática, embora a via de exportação Tat recentemente tem sido implicada na secreção de moléculas através da via do tipo II. **Fonte:** HENDERSON et al., 2004.

Estudos de genética populacional revelaram ausência de associação com a doença por linhagens evolutivas distintas de *A. actinomycetemcomitans*, com exceção do clone JP2-like, fortemente associado à periodontite agressiva (HAUBEK et al., 1996; KILIAN et al., 2006). A alta prevalência de isolados do sorotipo c e não JP2-like do sorotipo b em indivíduos com periodontite agressiva difere do que é esperado para um patógeno oportunista (HARASZTHY et al., 2000; KAPLAN et al., 2002; TINOCO et al., 1997). Dados sobre fatores de virulência como atividade da toxina CDT, obtidos neste laboratório, não demonstraram relação estreita com sorotipo, embora amostras do sorotipo a estejam entre aquelas com menor atividade (KAWAMOTO et al., 2009).

Estudos filogenéticos por Eletroforese de Enzimas Multilocus (*Multilocus nzyme electrophoresis*, MLEE) (HAUBEK et al., 1995) e Tipagem de Sequência Multilocus (*Multilocus sequece typing*, MLST) (HAUBEK et al., 2007) demonstraram que os sorotipos b e c são mais relacionados entre si do que o sorotipo a. Os estudos de comparação do genoma têm mostrado a diversidade evolutiva de *A. actinomycetemcomitans*, e revelaram que o isolado do sorotipo a apresentou grande rearranjo do genoma quando comparado ao sorotipo b, enquanto o genoma de um isolado sorotipo c foi amplamente colinear com o de HK 1651 (sorotipo b, JP2-like), grande rearranjo foi observado entre cepas do sorotipo a e dos sorotipos b/c (KITTCROTIRAT et al., 2010), e dois grandes grupos foram formados com: cepas do sorotipo a, d, e e f e um segundo grupo com cepas dos sorotipos b e c (KITTCROTIRAT et al., 2011). Além disso, estudo de comparação do genoma de 31 isolados de *A. actinomycetemcomitans* demonstraram uma maior similaridade entre os sorotipos b/c, e/f e a/d (KITTCROTIRAT et al., 2016).

Estudo recente deste laboratório (PINHEIRO et al., 2011) confirmou clara distinção entre os perfis de macrorrestrrição por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (*Pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE) para os sorotipos b e c, enquanto amostras do sorotipo a apresentavam-se distribuídas ao longo de todo o dendrograma, sugerindo maior rearranjo neste sorotipo. Não são conhecidos os mecanismos de recombinação em *A. actinomycetemcomitans*, entretanto uma transformação natural em *A. actinomycetemcomitans* parece ser isolado específica e a competência natural é detectada em baixa frequência (TØONJUM et al., 1990; WANG et al., 2002).

As cepas do clone JP2 apresentam homogeneidade genética por análise de genes *housekeeping* por MLST. No entanto, rearranjos genômicos de isolados pertencentes a este grupo foi mostrado por PFGE (ERIKSEN et al., 2005; HAUBEK et al., 2007; PINHEIRO et al., 2001).

O mecanismo de dano aos tecidos periodontais envolve a resposta imune contra bactérias periodontopatogênicas, que pode resultar na produção de fatores osteoclastogênicos derivados do hospedeiro, fatores pró-inflamatórios e proteases. Já foi demonstrado que indivíduos com periodontite avançada apresentam maiores títulos de IgG1 e IgG2 (imunoglobulina 1 e 2) totais do que pacientes que apresentam periodontite moderada (GRASWINCKEL et al., 2004). Frequentemente é observado marcante aumento nos níveis de anticorpos IgG contra antígenos de *A. actinomycetemcomitans* no soro de indivíduos com periodontite agressiva localizada (ANDO et al., 2010; EBERSOLE et al., 1983; GUNSOLLEY et al., 1988; KOMATSUZAWA et al., 2002; WATANABE et al., 1989). Esses anticorpos são dirigidos principalmente contra o LPS sorotipo específico (CALIFANO et al., 1989; FARIDA et al., 1986; WILSON; SCHIFFERLE, 1991b) e contra proteínas de membrana externa (BRUNHEIRA et al., dados não publicados; WATANABE et al., 1989). O soro de pacientes com periodontite com suspeita relação à infecção por *A. actinomycetemcomitans*, fortemente reagiu contra OMP100, OMP29 e OMP16, como também aconteceu com o soro de camundongos imunizados com *A. actinomycetemcomitans* Y4 (WILSON et al., 1991b). Na maioria dos casos de periodontite agressiva, a resposta contra OMP100 e OMP29 pode ser observada, entretanto quase 50% dos indivíduos analisados em outro estudo deste laboratório, que apresentam anticorpos séricos contra LPS de *A. actinomycetemcomitans*, foram soronegativos para estas OMPs (BRUNHEIRA, 2007), sugerindo expressão diferencial de *omp29* entre as amostras.

A caracterização da resposta humoral nas doenças infecciosas pode ocorrer pela resposta aos antígenos das células inteiras, mas a análise dos antígenos isolados pode indicar seu envolvimento com o processo da doença e com as funções biológicas dos anticorpos (KINANE et al., 1999). Os efeitos biológicos e clínicos de anticorpos contra bactérias patogênicas periodontais ainda não são totalmente compreendidos, bem como não está bem esclarecido o papel dos anticorpos para *A. actinomycetemcomitans* nas periodontites. Inicialmente, acreditava-se que níveis plasmáticos mais altos de IgG eram considerados

protetores na doença periodontal, mas esta teoria tem sido questionada (ALBANDAR et al., 2001). Níveis mais elevados de anticorpos séricos de IgG para *A. actinomycetemcomitans* ou *Porphyromonas gingivalis* foram encontrados em pacientes com periodontite estável quando comparados com aqueles que apresentavam periodontite ativa (RAMS et al., 2006). Por outro lado, a ausência de correlação entre os níveis de *A. actinomycetemcomitans* e títulos de IgG contra OMP100 e OMP29 determinados em indivíduos com periodontite agressiva, pode indicar que estas respostas séricas de anticorpos não foram protetoras (BRUNHEIRA et al., dados não publicados). De fato, foi postulado que os pacientes suscetíveis à periodontite são caracterizados pela produção de anticorpos não protetores (GEMMELL et al., 2002). Recentemente um estudo, em indivíduos de Israel, relatou que os níveis salivares de IgA contra *A. actinomycetemcomitans* eram mais altos em indivíduos saudáveis do que em indivíduos portadores de periodontite, quando estes foram analisados por antígenos de células inteiras de *A. actinomycetemcomitans* sorotipo a (BACHRACH et al., 2008).

Estudos clínicos demonstram diferenças na prevalência de periodontite agressiva em diferentes grupos étnicos, destacando uma alta prevalência da doença entre os indivíduos de certas populações africanas (RYED; KILIAN, 2008). O clone JP-2 like é associado às populações de origem africana (HAUBEK et al., 1996; HAUBEK; WESTERGAARD, 2004). Mas, outros fatores podem estar implicados com a doença mais agressiva, além da maior produção de leucotoxina. Os níveis de anticorpos IgG no soro em indivíduos que apresentaram periodontite agressiva localizada contra *A. actinomycetemcomitans* (bactérias totais) sorotipos a, b e c, foi maior entre os afro-americanos do que em caucasianos (GUNSOLLEY et al., 1988, 1991). Os níveis séricos de anticorpos contra *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b foi maior nos grupos de afro-americanos, entretanto sem diferença estatisticamente significativa entre o grupo étnico-racial e os níveis de anticorpos (CRAIG et al., 2002). Dados do nosso laboratório, ainda não publicados, revelaram que a reatividade à OMP29 e OMP100 é geralmente associada a reatividade ao sorotipo b, no entanto, a reatividade para este sorotipo nem sempre leva à reatividade para ambas as OMP, especialmente entre os indivíduos de descendência africana, visto que 8 e 7 de 14 indivíduos com periodontite agressiva e reativos para este sorotipo, não reagiram com OMP29 e OMP100, respectivamente.

Micro-organismos, incluindo *A. actinomycetemcomitans*, têm sido encontrados profundamente no tecido conjuntivo e em contato com as fibras colágenas no interior do periodonto de indivíduos com periodontite agressiva (CARRANZA et al., 1983; GILLETT et al., 1982; SAGLIE et al., 1982), indicando colonização bacteriana aos tecidos sub-epiteliais. Entretanto, a literatura apresenta poucos estudos sobre a interação de OMPs de *A. actinomycetemcomitans* com as proteínas da matriz extracelular (*Extracellular matrix proteins*, pECM) e nenhuma informação sobre a interação de OMP29 de *A. actinomycetemcomitans* foi relatada. Algumas evidências têm mostrado a interação de OMP de bactérias patogênicas com as pECM. Por exemplo, OMPA-like de *Pasteurella multocida* adere às células hospedeiras via heparina e/ou fibronectina (DABO et al., 2003). *Bartonella quintana*, envolvida na febre recorrente, endocardite e angiomatose bacilar, sintetiza a proteína VompC (família da YadA) que confere a habilidade de ligação ao colágeno tipo IV. *A. actinomycetemcomitans* ApiA, também conhecida como OMP100 (ASAKAWA et al., 2003), membro da família de adesinas YadA, família das adesinas auto-transportadas, tem sido associada com a ligação à fibronectina e ao colágeno tipo II, III e V, bem como ao epitélio (KOMATZUSAWA et al., 2002; LI et al., 2004). Outra proteína de membrana externa de *A. actinomycetemcomitans*, EmaA, é associada com a ligação de *A. actinomycetemcomitans* aos colágenos tipo I, II, III, V, mas não ao colágeno tipo IV, e também liga-se à fibronectina imobilizada (MINTZ; FIVES-TAYLOR, 1999).

A fibronectina é uma proteína multi-domínio, com as várias regiões da proteína exibindo diferentes propriedades biofísicas. Há duas formas principais de fibronectina: fibronectina plasmática e fibronectina celular. A fibronectina plasmática é produto de hepatócitos e é encontrada no sangue, saliva e outros fluidos corporais. A fibronectina celular é secretada por uma variedade de células e incorpora-se a superfície celular dentro da matriz tipo fibrilar (HENDERSON et al., 2011). A fibronectina celular liga-se às células por sofrer alterações conformacionais que permitem a sua ligação aos membros da família das β_1 -integrinas, as quais estão presentes na membrana celular (HENDERSON et al., 2011).

Uma outra forma de fibronectina é a superfibronectina, uma fibronectina polimerizada/agregada, a qual gera uma interação fibronectina plasmática e anastelina (um fragmento do primeiro módulo da fibronectina tipo III (FNIII)), que é consideravelmente melhor na indução da adesão celular de fibronectina plasmática

(HENDERSON et al., 2011). É relevante informar que a sequência de fibronectina está notavelmente bem conservada ao longo de toda a sua extensão entre os animais superiores (fibronectina humana e de camundungo têm 91% de identidade).

A fibronectina é encontrada em fluidos corporais, sobre as superfícies das células e na matriz extracelular. A fibronectina atua com uma proteína da fase aguda em humanos e roedores, sendo seus níveis aumentados no sangue durante o processo inflamatório (PICK-KOBER et al., 1986). As proteínas bacterianas ligantes de fibronectina (*Fibronectin-binding proteins*, FnBPs) podem ligar-se somente à fibronectina insolúvel (celular), como YadA de *Yersinia*, ou a ambas, como a maior parte das FnBPs de *S. aureus* e *Streptococcus pyogenes*, e de algumas bactérias Gram-negativas como Tp0483 de *Treponema pallidum* (HENDERSON et al., 2011).

Fragmentos de fibronectina foram encontrados no fluido crevicular gengival de indivíduos com periodontite (HUYNH et al., 2002), e a ligação de *A. actinomycetemcomitans* à fibronectina solúvel resultaria em sua remoção pela saliva. Por outro lado, a ligação à fibronectina celular poderia resultar em adesão a diferentes células, como células epiteliais. Para isso, a bactéria teria que ultrapassar a barreira do epitélio e ligar-se à fibronectina na porção interna (basolateral) da superfície celular (HENDERSON et al., 2011).

A fibronectina é uma molécula TH1-específica em humanos, levantando a hipótese de que a ligação de bactérias com a fibronectina desempenha outras funções além da adesão (SANDIG et al., 2009). A ligação com fibronectina celular poderia também propiciar a ligação da bactéria com macrófagos inflamatórios/ativados e alveolares, que expressam receptores de fibronectina $\alpha_5\beta_1$, promovendo a fagocitose bacteriana (SHINJI et al., 1998, 2007), e permitindo a maior resposta imune ao micro-organismo.

Evidências crescem sobre o papel na sinalização de fibronectina e seus produtos de proteólise. A ligação com a fibronectina pode ocorrer em grande número de sítios, como representado por Henderson et al. (2011), e a fibronectina interage com uma série de proteínas do hospedeiro (Figura 3), como glicosaminoglicanos (principalmente heparina), vários colágenos, gelatina (colágeno degradado), DNA, fibrina, fibulina, transglutaminase de tecido e uma ampla variedade de integrinas de superfície celular (PANKOV; YAMADA, 2002). A fibronectina pode apresentar-se na forma de uma variedade de fragmentos individuais, resultado de proteólise, que apresentam capacidades de ligação específicas.

O fragmento amino-terminal 70 kDa da fibronectina, pode ser subdividido em dois domínios: um de 30 kDa (F30), que liga-se à heparina (*Heparin-binding domain*, HBD), e outro de 45 kDa que liga-se à gelatina (F45) (*Gelatin-binding domain*, GBD). A fibronectina gera fibrilas que ligam células à matriz extracelular, as quais são dependentes do módulo FnI (um dos domínios de ligação à heparina da fibronectina).

As fibronectinas atuam conectando o citoesqueleto intracelular com a matriz extracelular. A ligação da fibronectina às integrinas de superfície leva ao recrutamento de proteínas sinalizadoras e do citoesqueleto, promovendo a reorganização do citoesqueleto de actina e alteração do perfil de expressão gênica. *A. actinomycetemcomitans* é um organismo capaz de invadir células não fagocíticas, uma estratégia claramente associada à virulência, mediada pela OMP29 (KAJIYA et al., 2011).

A sobreposição de algumas regiões de reconhecimento de proteínas bacterianas com algumas regiões importantes regulatórias e regiões de interação intramolecular da fibronectina, sugerem que FnBPs bacterianas podem interferir na sinalização dos fragmentos de fibronectina. Por exemplo, a proteína F1, um peptídeo de 49 resíduos de *S. pyogenes*, derivado de partes de seus dois tipos de domínios de ligação de fibronectina, inibe a formação da matriz, sem afetar os aspectos relevantes do comportamento da relação células-matriz, bem como o crescimento celular e contatos focais (TOMASINI- JOHANSSON et al., 2001).

O epitélio gengival é a barreira primária frente ao desafio bacteriano. As células funcionam como uma barreira mecânica, por meio do complexo promovido pela junção célula-célula. Este complexo envolve junções celulares e junções *gap*, mecanismos contra a invasão de organismos patogênicos (FUJITA et al., 2006; KATZ et al., 2000; NOGUCHI et al., 2003; UCHIDA et al., 2001, 2005;).

O primeiro evento que caracteriza a ativação do sistema imune inato para o controle da infecção periodontal é o reconhecimento de componentes celulares bacterianos pelos receptores *Toll-like* (*Toll-like receptor*, TLRs) (MAHANONDA; PICHYANGKUL, 2007). Para a maioria dos TLRs, a ativação do receptor promove uma cascata de sinalização que conduz à ativação dos fatores de transcrição, tais como fator nuclear Kappa-B (NF- κ B) e fator regulador de interferon. A indução destes fatores de transcrição induz a expressão de vários mediadores pró-inflamatórios e outras proteínas, que aumentam a defesa do hospedeiro (MIGGIN;

O'NEILL, 2006). TLR2 é mais ativado por padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) de bactérias Gram-positivas, enquanto TLR4 estão mais associados à ativação de LPS enterobacteriano (ADEREM; ULEVITCH, 2000). Nos tecidos periodontais, TLR2 e TLR4 reconhecem bactérias de biofilme subgingival e participam no início e progressão de eventos imuno-inflamatórios, que medeiam a degradação de tecido conjuntivo e reabsorção do osso alveolar.

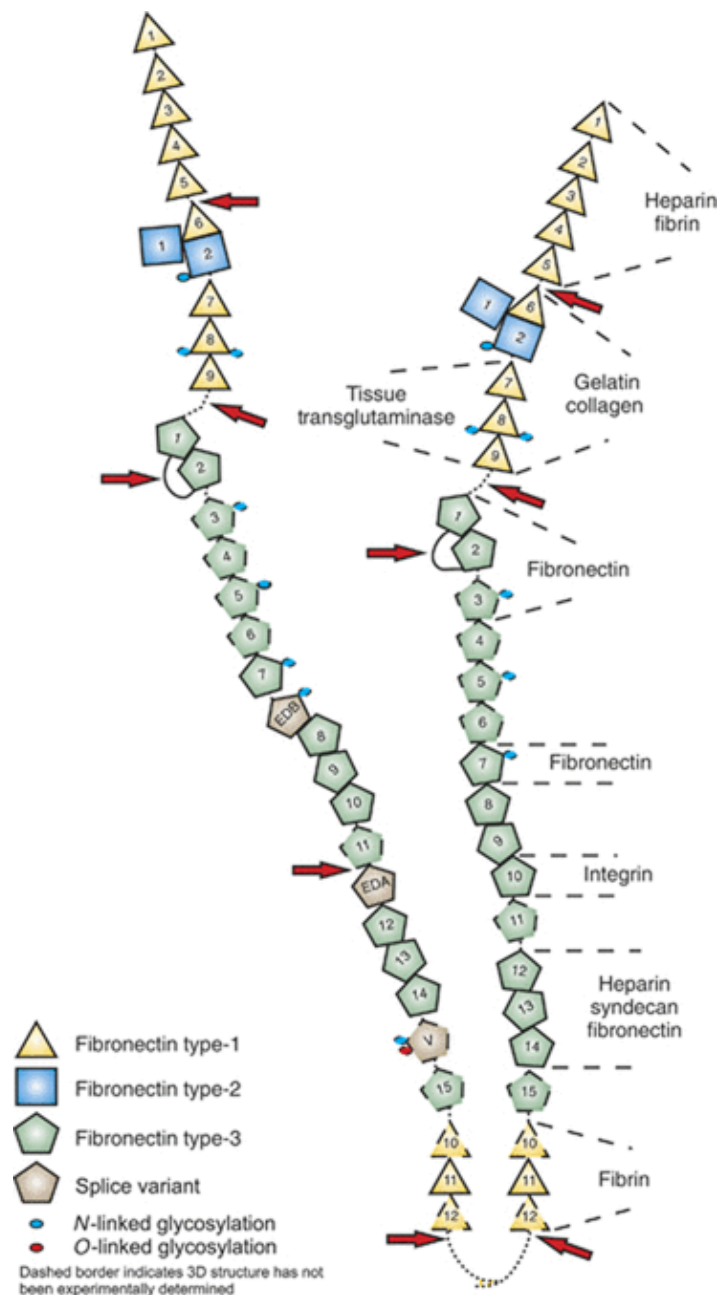


Figura 3- Diagrama esquemático da modular, arquitetura multi-domínio de um heterodímero da fibronectina celular. O ramo do lado esquerdo do dímero, neste exemplo, contém módulos variantes de ligações adicionais. Os locais de ligação conhecidos para outros

componentes da matriz extracelular, são indicados no ramo da direita. Esses módulos com estruturas tridimensionais determinados experimentalmente, são mostrados com uma borda sólida (ou por uma linha contínua de resíduos de interdomínios). Bordas pontilhadas e linhas de ligação indicam a falta de conhecimento experimental. O contato entre os símbolos para os módulos no diagrama, indica que os contatos entre os módulos são vistos em estruturas ou estão previstos devido ao comprimento curto do ligante entre os módulos adjacentes. Quando o contato é conhecido por ser extenso e ser um complexo rígido, os símbolos para cada módulo compartilham uma aresta comum, por exemplo, o grupo FNIII (8-10) de módulos em tandem. Locais de clivagem de protease (indicadas pelas setas vermelhas) coincidem com as regiões conhecidos ou esperados de flexibilidade. **Fonte:** HENDERSON et al., 2011.

De fato, o aumento da expressão de TLR2 e TLR4 foi observada em tecidos periodontais doentes, principalmente associado às células apresentadoras de antígeno, tais como macrófagos e células dendríticas (KAJITA et al., 2007; MORI et al., 2003). A sinalização de TLR2 e TLR4 nas células dendríticas estimula sua ativação, produção de citocinas, incluindo as interleucinas IL-1B, IL-12, IL-23, fator de necrose tumoral TNF- α e TNF- β (Tumor necrosis factor/ Fator de necrose tumoral α e β), e a expressão de receptores de quimiocina C (*C-C chemokine receptor*, CCRs). Esses receptores, incluindo CCR5 e CCR6, interagem com ligantes de quimiocinas específicas, mediando assim a migração de células dendríticas por meio do vaso linfático aferente para os nódulos linfáticos de drenagem, facilitando a apresentação de antígeno a linfócito (CUTLER; TENG, 2007; GEMMELL et al., 2002; WILENSKY et al., 2014). Os componentes da parede celular de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* estimulam TLR2 e TLR4. Em células humanas, *A. actinomycetemcomitans* induz a superexpressão de RNAs mensageiros de *tlr2* e *tlr4* (mRNAs) (KIKKERT et al., 2007) e TLR2 medeia a sinalização de apoptose de monócito humano (KATO et al., 2013). TLR1 reconhece PAMPs com especificidade para bactérias Gram-negativas. Em conjunto com TLR2, o heterodímero TLR1/TLR2 reconhece peptídeo glicano e lipoproteínas (JIN et al., 2007). OMPA é geralmente reconhecida por alguns organismos, por exemplo, OMPA de *Acinetobacter baumannii* induz a expressão de TLR2 em célula epitelial da laringe (KIM et al., 2008b), OMPA de *Shigella flexneri* ativa células B estritamente por meio do reconhecimento por TLR2, resultando na iniciação de uma cascata de eventos de transdução de sinal, envolvendo aumento da fosforilação da proteína tirosina quinase (*Protein tyrosine kinases*, PTK), via ERK (*Extracellular-signal-regulated kinases*/ Quinase regulada por sinal extracelular) e I κ B α (*Inhibitor of kappa B*/ Proteína inibitória do fator nuclear kappa B), promovendo

translocação nuclear de NF- κ B (BHOWMICK et al., 2014). OmpA de *K. pneumoniae* (KpOMPA) desencadeia a produção de citocinas por macrófagos e células dendríticas (*Dendritic cell*, DC), induz a maturação de DC e estimula as vias de sinalização por meio do receptor TRL2. KpOmpA também interage com os receptores de endocíticos expressos em DC e macrófagos (JEANNIN et al., 2000). Krishnan et al. (2013), demonstraram que camundongos recém nascidos *knockouts* em TRL2 são resistentes à *E. coli* K1, enquanto que os *knockouts* em TRL4 sucumbiram à infecção brevemente. *In vitro*, OMPA de *E. coli* K1 regulou positivamente a expressão TRL2 em células endoteliais microvasculares do cérebro humano, enquanto que *E. coli* K1 deficiente em OMPA aumentou a expressão de TRL4.

Os domínios de oligomerização de nucleotídeo-ligante, NOD1 e NOD2 (*Nucleotide-binding oligomerization domain*, NOD), foram identificados como sensores citoplasmáticos para fragmentos de peptidoglicano, os quais induzem resposta inflamatória por meio de citocinas e mediadores inflamatórios (STEWART-TULL, 1980; YOSHIMURA et al., 1999). NOD1 reconhece γ -D-glutamil-meso-DAP, que é preferencialmente encontrado em bactérias Gram-negativas (CHAMAILLARD et al., 2003; GIRARDIN et al., 2003a), enquanto que NOD2 reconhece muramil dipeptídeo (MDP), que é encontrado virtualmente em todos peptidoglicanos bacterianos (GIRARDIN et al., 2003b). NOD1 e NOD2 têm sido referidos como envolvidos no reconhecimento de bactérias infecciosas, na indução de respostas imune e na eliminação de bactérias, por meio da ativação de fator nuclear kappa B (*Factor nuclear kappa B*, NF- κ B) (KIM et al., 2008a; VIALA et al., 2004). NOD1 e NOD2 são expressos no epitélio oral e na bolsa periodontal (SUGAWARA et al., 2006). Devido ao aumento da expressão de NOD1 e NOD2 nos sítios de inflamação gengival, portanto, provavelmente desempenham um papel no desenvolvimento da periodontite (OKUGAWA et al., 2010).

Doenças periodontais são afetadas pela produção de mediadores inflamatórios e a consequência deste efeito é a promoção da destruição significativa dos tecidos de sustentação dos dentes, que pode conduzir à perda do elemento dental (KORNAMAN et al., 1997). Os processos apoptóticos (JINADASA et al., 2011; SHENKER et al., 2015a), bem como os eventos de evasão do sistema imune, também estão envolvidos na patogênese da doença periodontal (HAJISHENGALLIS, 2011; KIESELBACH et al., 2015).

A inflamação periodontal é dominada pelas citocinas da família da interleucina IL-1 (BELIBASAKIS; JOHANSON, 2012), incluindo IL-1 β e IL-18. Essas citocinas são essenciais para a resposta inflamatória do hospedeiro nas doenças periodontais (DELIMA et al., 2002; GRAVES; COCHRAN, 2003;). Na periodontite, os níveis de IL-1 β apresentam-se mais elevados no fluido crevicular gengival (ENGBRETSON et al., 2002) ou nos tecidos gengivais (BOSTANCI et al., 2009). Os macrófagos são a fonte principal de IL-1 β no tecido inflamado (DINARELLO et al., 1996). Esta citocina é produzida como um precursor inativo (pro-IL-1 β) que é subseqüentemente ativado por caspase-1, antes de ser secretada como IL-1 β biologicamente ativa (THOMBERRY et al., 1992). A ativação de caspase-1 que induz a secreção de mais IL-1 β biologicamente ativa requer estímulos auxiliares conhecidos como organismos patogênicos ou associada a padrões moleculares associados a perigo (*Damage-associated molecular pattern molecules*, DAMPs) e PAMPs. Estes são sentidos por "inflamassomas", que são receptores de reconhecimento padrão (*Pattern recognition receptors*, PRR), os quais formam plataformas moleculares oligoméricas (SCHRODER; TSCHOPP, 2010). A interleucina 1 β é uma importante citocina pró-inflamatória, produzida por várias células, incluindo macrófagos e também atua em células endoteliais, aumentando a expressão de moléculas que medeiam a adesão de leucócitos para o local da inflamação. A interleucina 18 é membro da superfamília de ligante IL-1 e é produzida principalmente por células apresentadoras de antígenos (*Antigen-presenting cell*, APCs) (BIET et al., 2002; NAKANISHI et al., 2001) e também por osteoblastos, células do córtex adrenal (KASHIWAMURA et al., 2002) e, células epiteliais orais (SUGAWARA et al., 2001). Tem sido encontrada em várias doenças inflamatórias crônicas, incluindo a doença periodontal (FIGUEREDO et al., 2008; OZÇAKA et al., 2011). IL-18 poderia desempenhar um papel importante na progressão da doença periodontal em decorrência da sua propriedade quimiotática, pró-inflamatória e angiogênica, e esta citocina também aumenta as taxas de ativação de neutrófilos (FIGUEREDO et al., 2008).

Os inflamassomas consistem: de "sensor" (ou "scaffold"), receptores de ligação a nucleotídeo-ligante (*Nucleotide-binding oligomerization domain receptor*, NLR), proteína mediadora "adaptadora" de partícula apoptótica contendo um domínio de recrutamento de caspase C-terminal (*Caspase recruitment domain*, ASC), e a "efetora" pró-caspase-1. O reconhecimento de PAMPs ou DAMPs por

inflamassomas, desencadeia a clivagem de pró-caspase-1 na sua forma ativa, por sua vez, ativa IL-1 β na sua forma secretada madura (BELIBASAKIS; JOHANSON, 2012). O NLRP3 é o mais bem caracterizado, o qual é ativado em resposta aos sinais de estresse celular (OGURA et al., 2006), bactérias inteiras e vírus, ou pelos seus fatores de virulência (CRAVEN et al., 2009; GROSS et al., 2009; MARIATHSAN et al., 2006; NG et al., 2010) e provavelmente desempenha um papel-chave na doença periodontal (BOSTANCI et al., 2009). NLRP2 é bem menos estudado, mas é responsável por inibir a interação NLRP3-ASC (CHAE et al., 2003, 2006). NLRP6 foi identificado como um regulador crítico do sinal transducional pró-inflamatório, especialmente por meio da ativação de NF- κ B e caspase 1 (GRENIER et al., 2002).

A apoptose, conhecida como morte celular programada, é um processo complexo que demanda energia, e é ordenado por uma cascata de eventos moleculares. As células apoptóticas apresentam alterações morfológicas por consequência de ações de proteases cisteinil aspartato específicas, denominadas caspases, envolvidas em ambas as vias da apoptose, a extrínseca e a intrínseca (BURZ et al., 2009). A via intrínseca, também chamada mitocondrial, pode ser desencadeada por vários estímulos como, por exemplo, o estresse celular e danos ao DNA, sendo estes processos mediados pela família da BCL-2 (*B-cell lymphoma 2/ Célula-B de linfoma 2*) e pelo acometimento mitocondrial (KUZENKO et al., 2015; VANGESTEL et al., 2009). A morte celular induzida por ativação (*Activation-induced cell death, AICD*) é um processo de apoptose de linfócito T, desencadeado pela re-estimulação via TCR/CD3 (*T cell receptor/Receptor de célula T/ Cluster of differentiation/ Agrupamento de diferenciação 3*). Esse processo foi descrito inicialmente em hibridomas de linfócitos T, e posteriormente em linfócitos T maduros pré ativados e em sub-populações de linfócitos T CD4⁺, e é dependente da interação do receptor de morte FAS (CD95) com seu ligante cognato, FASL (*FAS ligand*) (CD95L) (JU et al., 1995; VAN PARIJS et al., 1996). O receptor FAS é membro da superfamília dos receptores de TNF, uma proteína transmembrânica constitutivamente expressa em uma variedade de células, incluindo células B e T e pode ainda ter sua expressão aumentada após a ativação celular (NAGATA et al., 1995). FASL também é uma proteína transmembrânica, entretanto sua expressão é limitada a poucos tipos celulares e pode ser altamente induzida em linfócitos T, após a estimulação do seu receptor (TCR) (ALDERSON et al., 1995; DHEIN et al., 1995).

A proteína transmembrânica, CD74, expressa como um homotrímero, tem funções específicas como chaperona de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (*Major histocompatibility complex*, MHC) tipo II e como molécula co-estimulatórias de células imunológicas. A expressão de CD74 pode ocorrer independentemente de MHC II, e atua adicionalmente como: receptor de superfície celular para o fator de inibição de macrófagos (*Macrophage migration inhibitory factor*, MIF), receptor para o *Helicobacter pylori*, facilitando a adesão deste patógeno às células epiteliais gástricas e, moléculas de sinalização acessória em processos de proliferação celular (BESWICK; REYES, 2009). A via de sinalização clássica mediada por MIF foi demonstrada em algumas células imunológicas, como macrófagos e células B, e inicia-se com a ligação deste fator ao receptor de superfície CD74 (GORE et al., 2008; LENG et al., 2003; MILLER et al., 2008; SHI et al., 2006). Esta ligação envolve também a fosforilação de CD44 (proteína sinalizadora), que por sua vez desencadeia a fosforilação de MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*/ Proteína quinase ativadas por mitógenos)/ERK, envolvidas na expressão de ciclina D1, síntese de DNA e inibição de apoptose (LIAO et al., 2003; SHI et al., 2006; SWANT et al., 2005). Houve anormalidade no desenvolvimento de células B, em ensaio com camundongo deficiente para CD74 (SHACHAR; FLAVELL, 1996), entretanto sem alteração na expressão de MHC II. Variações semelhantes no fenótipo também ocorreram em camundongo deficiente para o MIF, mimetizando o camundongo deficiente em CD74 (LENG; BUCALLA, 2006). A ligação de MIF ao CD74 promove ativação da via MAPK/ERK, com consequente proliferação celular e ativação da fosfolipase A2, importante componente da cascata inflamatória para a produção de prostaglandina 2 (LENG et al., 2003; MITCHELL et al., 1999).

As moléculas de FAS quando trimerizadas ativam o receptor, induzida pelo ligante, e conseqüentemente há o recrutamento de moléculas adaptadoras FADD (*FAS-associated death domain*/ Proteína de domínio de morte associada ao receptor FAS), que se ligam ao receptor FAS por uma interação homodimérica (DD-DD) (CHINNNAIYAN et al., 1995). O domínio efetor de morte (*Death effector domain*, DED), é um outro domínio da molécula FADD, o qual interage com o mesmo domínio DED presente na procaspase-8, recrutando-a. Este complexo multimolecular é nomeado complexo indutor de sinalização de apoptose (*Death inducing signalling complex*, DISC). Quando sofre ativação autocatalítica, a

procaspase-8, desliga-se do DISC e ativa caspases efetoras, como caspase-3, 6 e 7 (TSCHOPP et al., 1998). Alguns substratos, como enzimas reparadoras de DNA, proteínas estruturais, endonucleases e muitos outros constituintes celulares, são clivados pelas caspases ativadas promovendo apoptose celular (COHEN, 1997; NAGATA et al., 1995; ROSEN; CASCIOLA, 1997). Evidentemente, a maioria dos casos de ligação de FAS com FASL associado à membrana, induz rapidamente uma cascata proteolítica, que resulta na morte celular por apoptose (ISHIWATARI-HAYASAKA et al., 1997; OSHIMI et al., 1996).

A molécula de adesão celular vascular-1 (*Vascular cell adhesion protein 1*, VCAM-1) é uma glicoproteína de adesão de superfície celular para determinados leucócitos e células tumorais, a qual é expressa pelo endotélio ativado em uma variedade de condições patológicas, como a arterosclerose (CYBULSKY et al., 1991). Têm sido demonstrado, *in vitro*, que estas moléculas de superfície de células endoteliais induzida, medeiam adesão intercelular por meio da interação com um contra-receptor, a integrina antígeno 4 tardio (*Very Late Antigen 4*, VLA4), que é expressa em monócitos, linfócitos, basófilos, eosinófilos e certas células tumorais, mas não em neutrófilos (BOCHNER et al., 1991; ELICES et al., 1990; RICE et al., 1990; TAICHMAN et al., 1991).

A caspase-8 pode clivar Bid (*BH3-interacting domain death agonist/ Agonista de morte que interage com o domínio BH3*) (LUO et al., 1998), um membro da família BCL-2, gerando um fragmento pró-apoptótico chamado tBid (Bid truncado) que cliva Bax (*BCL-2 associated X protein/ Proteína X associada ao BCL-2*) ou Bak (*BCL-2 antagonist killer/ Assassino 1 antagonista de BCL-2*) (KORSMEYER et al., 2000) e promove a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma. Este processo ocorre quando a síntese de caspase-8 não é apropriada para ativar caspase-3 para promover apoptose. Um complexo, chamado apoptossomo, é formado quando o citocromo c liga-se a protease ativadora do fator 1 (*apoptotic-protease-activating fator-1*, APAF-1) recruta a pró-caspase-9, que inicia uma cascata de ativação de caspases, que culmina na caspase-3, molécula responsável pela indução dos principais fenótipos apoptóticos (LI et al., 1997). A Figura 4 representa um esquema simplificado das duas vias iniciadas pela ativação do receptor FAS. A BCL-2 é uma oncoproteína da família BCL2, que está localizada no cromossomo 18q21 (HOCKENBERY et al., 1990). Foi inicialmente descrita em um linfoma não-Hodgkin de células B, e que tem como função a inibição da apoptose, favorecendo a

sobrevivência da célula (CARLINFANTE et al., 2005; HASNAN et al., 2010), entretanto a sua superexpressão está associada ao desenvolvimento de malignidades (COTTER, 2009).

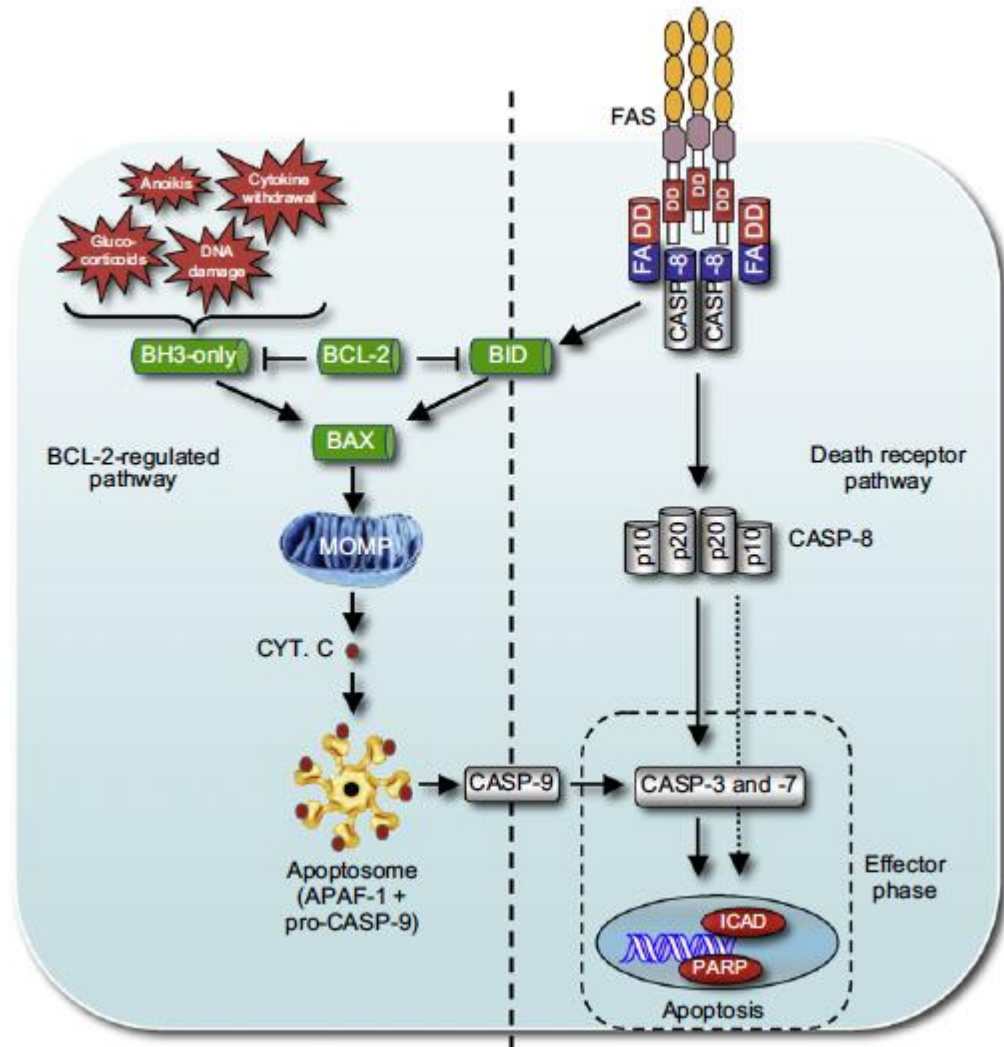


Figura 4- Via de sinalização de FAS/FASL. **Fonte:** STRASSER et al., 2009.

O sistema complemento desempenha um papel importante na imunidade não específica. É composto por 30 proteínas plasmáticas e de membrana, que são ativadas em três vias de reações distintas as quais convergem em C3, uma convertase, pivô central do sistema. A ação das três vias, clássica, alternativa e das lectinas forma o complexo de ataque a membrana (CAM), responsável pela atividade lítica em patógenos (MASTELLOS et al., 2015; NAKAO et al., 2011; NONAKA; SMITH, 2000). Composto por várias proteínas solúveis, o sistema complemento está envolvido nos processos biológicos de fagocitose, opsonização, quimiotaxia de leucócitos e inativação de toxinas liberadas por bactérias (BOSHRA;

SUNYER, 2006, CLAIRE et al., 2002; NAKAO et al., 2011; SECOMBES, 1996). As proteínas do sistema complemento também estão envolvidas em reações inflamatórias e na exposição de antígenos aos linfócitos, recrutando células fagocíticas pela via clássica do sistema (BOSHRA; SUNYER, 2006; CLAIRE et al., 2002).

As proteínas quinase C (*Protein kinase C*, PKC) são conhecidas por serem ativadas por receptores acoplados à proteína G (*G protein-coupled receptors*, GPCRs), receptores de tirosina-quinase, e receptores de fatores de crescimento (STEINBERG, 2008). Ensaios utilizando *knockout* demonstraram que isoformas de PKC promovem uma grande variedade de doenças e disfunções de órgãos, incluindo processos inflamatórios. As principais isoformas de PKC expressas em neutrófilos são: PKC- α , PKC- β , PKC- δ , PKC- ζ , PKC- θ (PKRCQ) e de PKC- I/λ (BALASUBRAMANIAN et al., 1998, 2002; DANG et al., 1994). A proteína PKRCQ (PKC- θ) atua na ativação de células T, e a estimulação de TCR, a proliferação celular, a produção de IL-2, e os mecanismos anti-apoptótico apresentaram-se reduzidos em células T *knockout* em PKC- θ (MANICASSAMY et al., 2006; PFEIFHOFER et al., 2003; SUN et al., 2000). A PKC- θ regula a afinidade da integrina β_2 LFA-1 a jusante do TCR. Quando integrina de linfócito associada ao antígeno 1 (*Integrin lymphocyte function-associated antigen-1*, LFA-1) é ativada, ocorre uma mudança conformacional para um estado de alta afinidade, e subsequente acontece uma captura de neutrófilos no endotélio. PKC- θ parece ser relevante para a inflamação, já que medeia as funções integrina-dependente em neutrófilos, permitindo, portanto que estes se mantenham aderidos em vênulas pós-capilares *in vivo* (BERTRAM et al., 2012).

A proteína associada à supressão de sinalização de citocina (*Suppressors of cytokine signaling protein*, SOCS), é regulada negativamente por receptores decoy e por receptores de citocinas solúveis e uma resposta “feedback” inibitória intracelular de indução por citocina (YOSHIMURA et al., 2007). A família SOCS consiste em oito proteínas: contendo proteína do domínio SH2 citocina induzida e SOCS-1 a -7 (ALEXANDER et al., 2004). A expressão de SOCS-1, SOCS-2 e SOCS-3 é induzida por uma grande variedade de citocinas, e devido à transcrição do gene *socs* ser induzida por um sinal transdutor induzido por citocina e ativador de transcrição (*Signal transducers and activators of transcription protein*, STAT) e, do fator de

transcrição NF- κ B, as proteínas SOCS correspondentes inibem a mesma via que inicia a sua produção, indicando que as proteínas SOCS fazem parte do ciclo de “feedback” negativo clássico (RAKESH et al., 2005; STARR et al., 1997). No entanto, o mecanismo pelo qual as proteínas SOCS são induzidas por citocinas inflamatórias e reguladas durante o desenvolvimento da doença periodontal, ainda precisa ser esclarecido.

A citocina TNF- α exerce sua atividade biológica por meio de 2 receptores cognatos de superfície celular, denominados receptores superfamília 1A de TNF (TNFRSF1A; p55) e receptor superfamília 1B de TNF (TNFRSF1B; p75). Ambos receptores TNFRSF1A e TNFRSF1B são glicoproteínas transmembrânicas, as quais podem induzir apoptose ou a sobrevivência da célula (PAPADAKIS; TARGAN, 2000). O receptor TNFR1 está presente na maioria das células do corpo e é um fraco indutor de sinalização de morte (FAUSTMAN et al., 2010). TNFR2 está presente nas células do sistema imune e geralmente induz sinais pró-sobrevivência, mas pode aumentar ou suprimir efeitos mediados por TNFR1 (FAUSTMAN et al., 2010). A ligação do TNF aos seus receptores cognatos, desencadeia a montagem de complexos de sinalização associados ao receptor, estimula a ativação de múltiplas vias de sinalização, incluindo: o fator nuclear κ B (NF- κ B), quinase N-terminal c-Jun (*c-Jun N-terminal kinase*, JNK) e a proteína quinase mitogênica ativada p38 (MAPKs), e, em alguns casos, a morte celular (HACKER; KARIN et al., 2006; LI et al., 2008; WAGNER; NEBRED, 2009; WALLACH et al., 2002). A ativação de NF- κ B resulta na expressão de genes que codificam proteínas pró-inflamatórias e anti-apoptóticas (SCHEIDEREIT, 2006). Esta citocina faz parte da mesma família do ligante do receptor do fator nuclear κ B (*Receptor activator of nuclear factor κ B ligand*, RANKL), estimulando a expressão de *cathepsina k* em pré-osteoclastos e em osteoclastos maduros (CORISDEO et al., 2001) e colabora na sobrevivência celular de células pré-osteoclásticas, juntamente com fator de estimulação de colônia de macrófago (*Macrophage colony-stimulating factor*/ M-CSF) (KOBAYASHI et al., 2000a). O papel da TNF- α na osteoclastogênese parece ser contraditório. Enquanto estudos demonstram que esta citocina possui atividade diretamente na ativação de osteoclastos independente de RANKL *in vivo* e *in vitro* (FULLER et al., 2002), outros trabalhos sugerem que esta citocina não induz a formação de osteoclastos (LAM et al., 2000). No entanto, a presença desta citocina parece agir de forma sinérgica quando associada ao RANKL na ativação da

diferenciação de osteoclastos (FULLER et al., 2002; LAM et al., 2000). Outros trabalhos sugerem a necessidade da presença de TNF- α juntamente com IL-1 α para que a osteoclastogênese ocorra (KOBAYASHI et al., 2000b). Em estudo *in vivo* com ratos deficientes em TNF- α , foram observadas menor inflamação e perda óssea em ensaio de periodontite experimental (GARLET et al., 2007).

Acreditava-se que inibidor de apoptose (*Inhibitor of apoptosis proteins*, IAP), como o próprio nome diz, funcionava somente na inibição de apoptose, principalmente por interferência direta, por meio dos seus domínios BIR, com atividade proteolítica das caspases (DEVERAUX et al., 1997). No entanto, vários estudos posteriores demonstraram que nem todas as IAPs protegem as células dos estímulos apoptóticos, e que entre as IAP de mamífero, XIAP é provavelmente o único membro da família capaz de inibir diretamente a caspase (ECKELMAN et al., 2006). Outros IAPs pró-sobrevivência, tais como cIAP1 e cIAP2 (BIRC3), ligam-se ao efetor da caspase-7 e -3, mas são ineficientes em interferir fisicamente nas atividades proteolíticas. Ao invés vez disso, foram sugeridos IAPs para neutralizar estas caspase-7 e -3, conjugando-os com cadeias K48-Ub que promovem a sua degradação proteossômica. A função de pró-sobrevivência de cIAP1/ 2 não está limitada à regulação de caspase, mas também envolve a sua capacidade de ativar, de forma E3 (*Ubiquitin E3 ligase complex/* Complexo de E3 ligase) dependente, a via canonical de NF- κ B, que direciona a expressão de várias moléculas pró-sobrevivência (BERTRAND et al., 2008; MAHONEY et al., 2008; SANTORO et al., 2007; VARFOLOMEEV et al., 2008). Além disso, cIAP1/ 2 protege as células da morte, regulando a atividade da proteína quinase de interação com proteína quinase de interação com o receptor (*Receptor-interacting protein kinases*, RIPK) -1 e -3 (DARDING; MEIER, 2012; VANDEN et al., 2014).

A proteína C-reativa (*C-reactive protein*, PCR) é um membro da família de pentraxina, proteína de ligação altamente conservada, associada ao ligante dependente de cálcio (KAPUR et al., 2015). A PCR é produzida por hepatócitos, em resposta às citocinas inflamatórias, tais como IL-6 e IL-1 (CICARELLI et al., 2005; DE VILLIERS et al., 1990). A PCR foi originalmente descrita por Tillet et al. (1930), como uma substância presente no soro de pacientes com inflamação aguda, e é atualmente usada como um biomarcador sensível para a infecção e inflamação, por ser uma das principais proteínas de fase aguda (KAPUR et al., 2015).

A proteína ligada ao receptor do fator de crescimento 2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*, GRB2), é uma proteína sinal adaptadora crucial, já que contribui para a proliferação e desenvolvimento normal de células, ligando outras proteínas à membrana, após o recrutamento de receptor do fator de crescimento epidérmico (*Epidermal growth factor receptor*, EGFR) ativados ou de receptor tirosina quinase (*Receptor tyrosine kinases*, RTK) (QU et al., 2014). Assim que EGFR, ou outros RTKs, são ativados, Grb2 recruta SOS1 para a membrana, de modo a formar complexo de Grb2-SOS1, que é importante para a sinalização de transdução, e ativação de Ras/ MEK /MAPK (geralmente reconhecido como ERK) (BALTENSBERGER et al., 1993).

Os fatores de transcrição ativados por várias cascatas de transdução intracelular controlam a expressão gênica que promove modificações a longo prazo. Os genes que codificam os fatores de transcrição da família Fos, desempenham um papel importante na regulação da expressão de genes numa variedade de células. Eles são prontamente induzidos em resposta aos diversos estímulos, incluindo a estimulação elétrica, perturbações fisiológicas, estresse e drogas psicotrópicas (HUGHES; DRAGUNOW, 1995; SHENG; GREENBERG, 1990). Diferentes padrões temporais foram observados, de acordo com a proteína Fos em questão, entretanto esta indução é geralmente transitória. Foi demonstrado que FOSB (*FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B/ Oncogene viral de osteosarcoma murínico FBJ homólogo B*) induz a ativação de morte de células T humanas, quando ocorre a dimerização com c-Jun mediado via TCR/CD3 (BAUMANN et al., 2003).

O receptor de glicocorticóide nuclear sub-família 3, grupo C, membro 1 (*Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1*, NR3C1) tem inúmeros efeitos supressores sobre células do sistema imunológico, tanto por uma regulação positiva ou negativa. Receptores de glicocorticóides podem interagir e inibir a função de ambos os membros da família AP1 (*Activating protein-1/ Ativação da proteína 1*) e NF- κ B e, assim suprimir um grande número de respostas para vias de sinalização pró-inflamatória, que convergem para fatores transcricionais (OGAWA et al., 2005). Estudos em macrófagos indicam que antagonistas ao receptor NR3C1 não interferem na ativação inicial de fatores de transcrição NF- κ B, em resposta à sinalização à TLR ou TNF (DE BOSSCHER et al., 2003). Entretanto, recentes estudos fornecem evidências de alterações dependente do receptor de glicocorticóide na expressão e/ou localização subcelular de MAPKs e, proteína

fosfatase mitogênica ativada que podem influenciar na ativação de proteínas AP1 e outros fatores de transcrição dependente de sinalização (BECK et al., 2008; CHO; KIM, 2009; DIEFENBACHER et al., 2008; QUANTE et al., 2008).

EP300 é uma proteína nuclear de 300 kDa, originalmente isolada do adenovírus, associada à proteína E1A. EP300, uma fosfoproteína, é um cofator de transcrição com atividade acetiltransferase intrínseca (GHOSH et al., 2007). Ep300 controla a expressão de numerosos genes de maneira específica para tipo celular e sinalização, e desempenha um papel crucial na proliferação, apoptose e na embriogênese. Catalisando acetilação das histonas e fatores de transcrição, EP300 desempenha um papel na regulação epigenética. Evidências sugerem que a função anormal de p300 está associada à expressão desregulada do gene alvo, podendo implicar em inflamação (GHOSH et al., 2007).

As isoenzimas ciclooxigenases (Cyclo-oxygenase, COX) são responsáveis por um dos passos enzimáticos seqüenciais na biossíntese dos prostanóides. Foi demonstrada a existência de duas isoformas da COX, a saber: COX-1 e COX-2, que são enzimas associadas à membrana (XIE et al., 1991). A isoforma constitutiva, COX-1, a qual está presente em muitas células e tecidos, induz a produção de prostaglandinas envolvidas na regulação de funções fisiológicas como citoproteção da mucosa gástrica, homeostasia renal e função plaquetária. A segunda isoforma, a COX-2, codificada pelo gene *ptgs2*, converte o ácido araquidônico em prostaglandina H2 endoperóxido (*Prostaglandin H2*, PGH2), e é indetectável em muitos tecidos, entretanto é rapidamente expressa em resposta aos estímulos inflamatórios e mitogênicos, sendo, portanto responsável pela formação das prostaglandinas associadas à resposta inflamatória (HABIB et al., 1993; HEMPEL et al., 1994; LYONS-GIORDANO et al., 1993).

A interleucina 12 é um heterodímero de 70 kDa composta por duas subunidades ligadas por dissulfureto: 35 kDa (IL-12 α) e 40 kDa (IL-12 β) (MA et al., 1996, MAES et al., 1999; COMMINS et al., 2010). Esta citocina proporciona uma ligação entre a resposta imune inata e adquirida, já que seu papel imuno-regulador promove um efeito antagonista do equilíbrio de citocinas de Th1 / Th2 (*T helper cells 1/2*/Células T auxiliaries 1/2) (MITEVA; STANILOVA, 2008). IL-12, que é produzido por células apresentadoras de antígenos, tais como monócitos / macrófagos, células dendríticas e células B, tem efeitos pleiotrópicos sobre as células T e células “natural killers”, incluindo o aumento da citotoxicidade e efeitos co-mitogênicos mediados por

células T (KOBAYASHI et al., 1989; TRINCHIERI, 1997; TRINCHIERI; SCOTT, 1999).

A interleucina 6 é produzida por linfócitos, monócitos, macrófagos, células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos e células tumorais (KISHIMOTO et al., 1995). Esta citocina é expressa em resposta à infecção, trauma ou desafio imunológico (KISHIMOTO et al., 1995). IL-6R é expresso por hepatócitos, neutrófilos, monócitos / macrófagos e alguns linfócitos, podendo ser encontrada na forma solúvel em sítios inflamados. Assim, IL-6 juntamente com IL-6R e o receptor gp 130, ativam a fosforilação intracelular (PABLOS ALVAREZ, 2009) de uma proteína chamada Janus quinase (Jak), que ativa o ativador de transcrição (STAT-3). STAT-3 entra no núcleo e ativa a expressão dos genes alvo (HEIRINCH et al., 2003). Além de STAT3, o receptor gp130 ativa a via das MAPK e a via PI3K/Akt, ambas de relevância na indução de fatores pró-inflamatórios de sobrevivência celular (HEIRINCH et al., 2003).

Interleucina 8 é uma quimiocina atratora de neutrófilos (BAGGIOLINI et al., 1994, 1997). Está envolvida em uma ampla variedade de processos fisiológicos e patológicos, que ocorrem desde a defesa do hospedeiro frente às infecções bacterianas ou fagocitose de tecido necrótico de várias desordens auto-imunes, incluindo, artrite reumatóide, psoríase e arterosclerose (GERSZTEN et al., 1999; HARADA et al., 1996). A IL-8 ativa com alta afinidade dois receptores, CXCR-1 (*Chemokine receptor 1/ Receptor de quimiocina 1*), que também reconhece uma segunda quimiocina, proteína quimiotática de granulócitos 2 (*G protein-coupled receptors, GCP-2*), e CXCR-2, o qual também pode ser ativada por várias outras quimiocinas, incluindo peptídeo de ativação de neutrófilo 2 (*Neutrophil-activating peptide-2, NAP-2*), oncogene a-g relacionado ao crescimento, e ativação da proteína 78 de ativação de neutrófilo, derivado de célula epitelial (ENA-78) (BAGGIOLINI et al., 1998; WUYTS et al., 1997). Ambos os receptores CXCR-1 e CXCR-2 são constitutivamente expressas em neutrófilos (HOLMES et al., 1991; MURPHY; TIFFANY, 1991).

A interleucina 10 é uma citocina do tipo II e faz parte da família de citocinas que incluem IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28 e IL-29. É uma citocina anti-inflamatória sintetizada principalmente por células T e macrófagos ativados. A IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF, IL-1 e IL-6, produzidas por macrófagos e monócitos ativados, estimulando a produção endógena

de citocinas anti-inflamatórias (MOSSER; ZHANG, 2008). A IL-10 suprime a reabsorção óssea em cultura de células de medula óssea de camundongos MF-1 (OWENS et al., 1996) e também age diretamente em células monocíticas precursoras de osteoclastos, inibindo a expressão de fator nuclear de ativação de células T, citoplasmático, dependente de calcineurina 1 (*Nuclear factor of activated T-cells, Cytoplasmic, Calcineurin-Dependent 1*, NFATc-1) (EVANS; FOX, 2007).

Portanto, os dados da literatura, sugerem que OMP29 de *A. actinomycetemcomitans* pode estar associada com a doença periodontal. Desta forma, visando contribuir com o conhecimento sobre o papel de OMP29 na virulência de *A. actinomycetemcomitans*, o objetivo deste estudo foi analisar filogeneticamente o gene *omp29* em amostras de diferentes sorotipos, determinar a interação de OMP29 com proteínas de matriz extracelular e o efeito da sua interação com células epiteliais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cepas bacterianas, plasmídeos e condições de crescimento

2.1.1 Condições gerais de crescimento de *A. actinomycetemcomitans*

As cepas de *A. actinomycetemcomitans* foram cultivadas na superfície de ágar TSBYE (ágar tripticase soja (Oxoid Ltda, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra), acrescido de 0,6% de extrato de levedura (Oxoid Ltda, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) e incubadas em estufa com atmosfera de 10% de CO₂ (Shel Lab, Oregon, EUA) a 37 °C entre 2 a 3 dias.

2.1.1.1 Condições de crescimento para determinação dos níveis de transcrição relativa de *omp29* em diferentes cepas de *A. actinomycetemcomitans*

Após crescimento das amostras (item 2.1.1) de *A. actinomycetemcomitans* (sorotipo b não JP2-like (G104-2, 194 e FDC Y4), JP2-like (G111-1, HK 1651 e JP2), sorotipo c (1519 e 721) e sorotipo a (707, C27-1 e C21-1), as colônias foram raspadas com alça Drigalski estéril, inoculadas em 8 mL de caldo TSBYE em triplicata e incubadas durante 8 horas em estufa com atmosfera de 10% de CO₂ a 37 °C. Após esse intervalo de tempo, a concentração da suspensão bacteriana foi ajustada a D.O._{495nm} ~1,0 por mensuração em espectrofotômetro (Jenway 6405UV/Vis Essex, Inglaterra), diluída 1:40 em caldo TSBYE e incubadas por mais 7 horas, até alcançarem o meio da fase exponencial. Em seguida, a concentração da suspensão bacteriana foi ajustada novamente a D.O._{495nm} ~0,2 (3 x 10⁸ UFC/mL).

2.1.1.2 Cepas bacterianas e plasmídeos para obtenção e complementação das mutantes de *A. actinomycetemcomitans*

Foi utilizada a cepa de *A. actinomycetemcomitans* D7S-1 (tipo selvagem, AaD7S) para a obtenção das mutantes de *A. actinomycetemcomitans* defectivas em *omp29* e *omp29* parálogo (*omp29^{par}*). Os plasmídeos usados encontram-se caracterizados na Tabela 1.

O vetor pCR[®]4-TOPO[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foi replicado em cepas hospedeiras de *E. coli* DH5- α , de acordo com as normas do fabricante, e o

vetor pKM2/ltxP foi utilizado para complementação das mutantes de *A. actinomycetemcomitans*. Para a seleção de transformantes ou mutantes, espectinomicina (Spec, 50 µg/mL), tetraciclina (Tc, 4 µg/mL), ampicilina (Amp, 100 µg/mL), canamicina, (Kn, 100 µg/ml) e cloranfenicol (Cm, 50 µg/mL), foram adicionados ao meio de cultura.

Tabela 1- Plasmídeos usados neste estudo

Plasmídeos	Descrição	Referência
pKM2/ltxP (pVT1642)	pKM2 contendo ~ 500 pb do promotor ltx, Cmr.	Tang & Mintz, 2010
pAT/Cre	Tcr; plasmídeo de <i>E. coli</i> A. <i>actinomycetemcomitans</i> ; derivado do pPK1 contendo o gene <i>cre</i> .	Fujise <i>et al.</i> , 2008
plox2-Spec ^r	Ampr, Sper; derivado do vetor pBluescript II KS, contendo 2 sítios mutantes (loxP2) (a sequência do espaçador loxP2: ATGgATGCa), flanqueando o gene de resistência a espectinomicina.	Cheng <i>et al.</i> , 2014
pCR4- TOPO	Ampr, Knr; vetor de clonagem	Invitrogen

2.1.2 Condições gerais de crescimento de *Escherichia coli*

As células de *E. coli* cresceram em meio de cultivo Luria-Bertani (LB) e foram incubadas a 37 °C por 1 dia. Para a seleção de transformantes, ampicilina (Amp, 100 µg/mL) e canamicina, (Kn, 100 µg/ml) e cloranfenicol (Cm, 50 µg/mL), foram adicionados ao meio de cultura.

2.2 Análise filogenética baseada nas sequências de *omp29* e *omp29^{par}* e da região promotora

A análise filogenética dos genes *omp29* e *omp29* parálogo (*omp29^{par}*) foram realizadas com 19 cepas de *A. actinomycetemcomitans* e 2 cepas de *Haemophilus aphrophilus* (ATCC333890578 e NT05HA0556, *outgroup*) (Tabela 2), as quais permitiram o enraizamento das árvores filogenéticas. A análise *in silico* dos promotores foi realizada utilizando o site <http://molbiol-tools.ca/Promoters.htm>, o qual

previu a posição do início do promotor e, sequências de 300 pb foram estabelecidas para todas as cepas. As sequências de *omp29* e *omp29^{par}* foram obtidas a partir da base de dados do pangenoma (KITTIHOTIRAT et al., 2011).

A análise filogenética dos promotores de *omp29* e *omp29^{par}* foram realizadas com sequências de 15 e 18 cepas de *A. actinomycetemcomitans*, respectivamente, e de duas cepas de *Haemophilus aphrophilus* (ATCC333890578 e NT05HA0556, *outgroup*). O número de amostras variou entre as análises dos promotores de *omp29* e *omp29^{par}*, já que os promotores que foram previstos com menos de 300 pb ou que não puderam ser previstos, não foram utilizados. A análise da distância foi realizada por pelo método Jukes Cantor (JUKES; CANTOR, 1969) e as árvores filogenéticas construídas pelo método de Neighbor Joining (SAITOU; NEI, 1987).

Tabela 2- Isolados de *A. actinomycetemcomitans* usados na análise filogenética

Isolados	Sorotipo/Genótipo	¹ Diagnóstico	Idade/Raça	Origem	² Gene ID <i>omp29</i>	² Gene ID <i>omp29</i> parálogo
D17P3	a	PAL	24/Asiático Americano	E.U.A	D17P3_0393	D17P3_0878
D7S-1	a	PAG	29/Afro-americano	E.U.A	D7S_0402	D7S_00447
H5P1	a	PS	27/Asiático Americano	E.U.A	H5P1_2182	H5P1_2217
HK1651	b/ JP2-like	PAL/PAG	18/Africano	Gana	AA02458	AA02479
ANH9381	b/ não JP2-like	PS	50/Caucasiano	Finlândia	ANH9381_1942	ANH9381_1059
SCC1398	b/ não JP2-like	PAL	25/Caucasiano	Finlândia	SCC1398_0114	SCC1398_0099
SCC4092	b	PAL	25/Caucasiano	Finlândia	SCC4092_0446	SCC4092_0068
S23A	b	PC	48/Caucasiano	Finlândia	S23A_2378	S23A_2378
RHAA1	b/ não JP2-like	-	Macaco Rhesus	-	RHAA1_08783	RHAA1_10526
I23C	b/ não JP-like	PC	48/Caucasiano	Finlândia	I23C_1051	I23C_0941
163B	d	PS	49/Caucasiano	Finlândia	I63B_0492	I63B_1875
SC1083	e	desconhecido	Desconhecidas	E.U.A	SC1083_1928	SC1083_0683
SCC393	e	PC	40/Caucasiano	Finlândia	SCC393_1292	SCC393_1292
D18P-1	f	PAG	20/Asiático- Americano	E.U.A	D18P1_0884	D18P1_1325
D11S-1	c	PAG	16/Afro-americano	E.U.A	D11S_1573	D11S_1588
D17P-2	c	PAL	24/Asiático Americano	E.U.A	D17P2_1388	D17P2_1373
AAS4A	c	GC	33/Caucasiano	Finlândia	AAS4A_0603	AAS4A_0618
SCC2302	c	GC	33/Caucasiano	Finlândia	SCC2302_1156	SCC2302_1117
ATCC 33389	<i>A. aphrophilus</i>	-	-	-	ATCC33389_057 8	ATCC33389_0411
NJ8700	<i>A. aphrophilus</i>	-	-	-	NT05HA_0556	NT05HA_0794

¹PC, periodontite crônica; PAL, periodontite agressiva localizada; PAG, periodontite agressiva generalizada; PS, periodonto saudável; GC, gengivite crônica.

²Gene ID utilizado na análise filogenética, disponível no endereço: http://expression.washington.edu/genetable/script/gene_table_viewer.

2.3 Determinação dos níveis de transcrição relativa de *omp29* em diferentes cepas de *A. actinomycetemcomitans*.

2.3.1 Extração de RNA

As células bacterianas foram obtidas no meio da fase exponencial, após desenvolvimento em caldo TSBYE (como descrito no item 2.1.1.1), em atmosfera de 10% de CO₂ a 37 °C. O RNA foi extraído pela adição de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As suspensões bacterianas foram coletadas após incubação por 2 horas e centrifugadas a 5.200 x g por 4 minutos (Eppendorf – Centrifuge 5402, Hamburg, Alemanha), a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, o precipitado ressuspenso em 320 µL de Trizol e as suspensões agitadas e incubadas por 5 minutos a 25 °C.

Após o tratamento com Trizol, foram adicionados 107 µL de clorofórmio (Synth, São Paulo, Brasil), a suspensão foi agitada manualmente por 15 segundos e o lisado incubado novamente por mais 15 minutos a 25 °C, seguido de centrifugação a 12.000 x g/ 15 minutos/ 4 °C. O RNA na fase aquosa foi transferido para um novo tubo estéril e precipitado pela adição de 270 µL de álcool isopropílico (Merck, Darmstadt, Alemanha). Seguiu-se incubação por 10 minutos/ 30 °C e centrifugação a 12.000 x g/ 10 minutos/ 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o RNA foi lavado com 600 µL de etanol 75% (Synth, São Paulo, Brasil) e centrifugado a 7500 x g/ 5 minutos/ 4 °C. O sobrenadante foi novamente desprezado e o RNA ressuspenso em 50 µL de água livre de RNase (Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA). Para remover os traços do DNA contaminante, as amostras foram tratadas com 2 µL de DNase I (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e incubadas a 25 °C por 10 minutos. A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro, juntamente com a confirmação da presença do RNA em gel de eletroforese, contendo 1,5% de agarose.

2.3.2 Síntese de cDNA e PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Para a síntese de c-DNA, foi utilizada reação contendo 1 µL do RNA total (obtido como descrito no item 2.3.1), 1 µL de hexâmeros randômicos (50 ng/µL), 1 µL de dNTP (10 mM) e 7 µL de H₂O livre de Rnase, em um volume total de reação de 10 µL. A mistura da reação foi incubada a 65 °C por 5 minutos e posteriormente

resfriada em gelo por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados à mistura 2 µL de 10X RT buffer, 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 2 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de Rnase OUT (40 U/µL) e 1 µL de Super Script III RT (200 U/µL) do kit Platinum quantitative RT-PCR Thermoscript one-step system (Gibco, Grand Island, NY, EUA). As reações de transcriptase reversa foram incubadas por 10 minutos a 25 °C, 50 minutos a 50 °C e 5 minutos a 85 °C. Posteriormente, foram centrifugadas e foram adicionadas às reações, 1 µL de Rnase H, e finalizadas com nova incubação a 37 °C por 20 minutos. Foram utilizados 2 controles: a) sem adição de RNA; b) com adição de RNA e sem adição de Super Script III RT. O c-DNA foi estocado a -20 °C até o momento do uso.

Para as reações de qRT-PCR de *omp29* foi utilizado 10 µL de SYBR Green, 2 µL DNA molde, 0,16 µL (200 mM) de cada iniciador (5'ACTGCAATCGCATTAGCTATC3' e 5'CGCCGTAAGCCTCAGAATTAC3'), sendo um volume total de 20 µL e o ciclo foi realizado com desnaturação 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 50 °C por 1 minuto, 83 °C por 10 segundos, e então seguidos de duas fases de 95 °C por 15 segundos, 70 °C por 1 minuto e a fase final de 0,5 °C - 95 °C (ramp) por 10 segundos. O tamanho do produto esperado para a reação era de 175 pb. O par de iniciadores, utilizados para determinar os níveis de transcritos, são específicos para *omp29* e, portanto, não apresenta homologia com *omp29^{par}*.

O gene *16S rRNA* foi usado como controle endógeno e para as reações de qRT-PCR foi utilizado 10 µL de SYBR Green, 1 µL DNA molde, 1 µL (200 mM) de cada iniciador (RAMSEIER et al., 2009), sendo um volume total de 20 µL e ciclo foi realizado com desnaturação de 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 65 °C por 1 minuto, 85 °C por 10 segundos, e então seguidos de duas fases de 95 °C por 15 segundos, 70 °C por 1 minuto e a fase final de 0,5 °C - 95 °C (ramp) por 10 segundos. O tamanho esperado para a reação era de 276 pb.

Todas as amplificações foram realizadas em grades ópticas em placas de 96 poços e os dados de fluorescência foram processados usando o StepOnePlus™ Real-Time PCR System ((Thermo Fisher Scientific, Rockford, EUA) e resultaram em valores de “limiar” de ciclo (Cycle Threshold - CT) para cada amostra. As

dosagens gênicas foram obtidas por meio do método comparativo do $\Delta\Delta CT$ (PFAFFL, 2001).

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa GraphPad Software Inc (La Jolla, CA, EUA), empregando o teste *Kruskal Wallis* seguido de pós-teste de *Dunns* quando os soro-grupos foram comparados e *One-way ANOVA* seguido de pós-teste de *Dunnet* quando as cepas foram analisadas individualmente (cepa controle HK 1651). As diferenças entre os grupos ou entre as cepas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

2.4 Obtenção de OMP29 recombinante

2.4.1 Obtenção de *E. coli* recombinante em *omp29*

Os fragmentos de DNA de *A. actinomycetemcomitans* que codificam OMP29 foram amplificados por meio da construção dos oligonucleotídeos (TOPO OMP29 F e TOPO OMP29 R, Tabela 3), baseada na sequência do gene *omp29* de *A. actinomycetemcomitans* HK1651 (Acesso ao Genbank AY 262734). O produto foi extraído do gel utilizando o kit de purificação QIAquick Gel Extraction (Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA). A seguir, este produto foi ligado ao vetor pCR[®]4-TOPO[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e transformado em *E. coli* DH5- α eletrocompetente, seguindo as instruções do fabricante, originando o plasmídeo pTOPOomp29. O gene *omp29* contendo os sítios de restrição para *BamHI* e *XhoI*, foi obtido a partir do plasmídeo pTOPOomp29, com uso de iniciadores pET OMP29 F e pET OMP29 R (Tabela 3). Os iniciadores pET OMP29 (F e R) foram desenhados baseados na análise feita pelo SignalP 3.0 Server, o qual faz predição sobre a sequência do gene que codifica o peptídeo sinal. As reações de amplificação foram compostas por 5 μ L de 80 ng de DNA, 5 μ L de 25 pmoles/ μ L de cada oligonucleotídeo (Invitrogen, SP, Brasil), 10 μ L de tampão 10 X contendo Mg^{+2} (1,5 mM) (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 5 μ L de $MgCl_2$ (50 mM), 4 μ L de dNTP (100 mM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e *Taq* polimerase (2,5 U) (Invitrogen, SP, Brasil) em um volume final de 100 μ L. As reações foram realizadas em termociclador (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400, Waltham, MA, EUA), compreendendo de desnaturação inicial de 95 °C/ 5 minutos, seguindo-se 30 ciclos de 95 °C/ 30 segundos, 51 °C/ 30 segundos, 72 °C/ 1 minuto e extensão final de 75 °C/ 5 minutos.

Tabela 3- Oligonucleotídeos para amplificação do gene *omp29* e tamanho dos produtos da reação

Amplicon (pb)	Oligonucleotídeo	Sequência
<i>omp29</i> (1) (1561)	TOPO OMP29 F TOPO OMP29 R	5' GATTTTCGGCTTTTTAGTAGGATA 3' 5' ATGTTTGGCTCGGGTATTTA 3'
<i>omp29</i> (2) (1051)	pET OMP29 F - <i>Bam</i> HI pET OMP29 R - <i>Xho</i> I	5' TGAAAAGGGATCCAATCGCATT 3' 5' AACTCGAGAATTATTTACTACCG 3'

Sublinhado: sítios de restrição paara as enzimas *Bam*HI e *Xho*I em *omp29* (2).

Após reação de PCR o amplicon sem o peptídeo sinal foi novamente ligado ao vetor TOPO®-TA, originando o plasmídeo pTOPOomp29SPS. Em seguida, o vetor pET28B (pET Expression System 28, Novagen) e pTOPOomp29SPS foram digeridos com *Bam*HI e *Xho*I, seguindo as instruções do fabricante (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). Após corrida eletroforética, o fragmento *omp29* de pTOPOomp29SPS foi excisado do gel e purificado. O mesmo procedimento foi realizado para obtenção do vetor pET28B linearizado. O fragmento *omp29* sem peptídeo sinal foi ligado ao vetor pET28B, de acordo com recomendações do fabricante.

Os produtos da ligação foram transformados em *E. coli* DH5- α e após confirmação da sua identidade, foram purificados e transformados por eletroporação em *E. coli* BL21 (DE) (Micro Pulser BioRad, Hercules, CA, EUA), conforme as instruções do fabricante. Após a transformação, alíquotas da suspensão bacteriana foram inoculadas em ágar Luria-Bertani (LB) acrescido de canamicina à uma concentração final de 50 μ g/mL, para a obtenção da recombinante OMP29 (OMP29^{his}). Após o desenvolvimento bacteriano, foi determinada a presença de plasmídeos recombinantes. O precipitado de 1 mL de cada cultura foi ressuscitado em 80 μ L de solução contendo 0,1% de azul de bromofenol (Amershan, cat n. US12370, Austria), 6% de sacarose, 0,2 μ g/mL de RNase (USB, EUA) e 28 μ L de clorofórmio-fenol (1:1). As suspensões foram centrifugadas e 10 μ L dos sobrenadantes foram transferidos para poços em gel de agarose a 1%, em tampão TAE, e realizada a corrida eletroforética, para verificar a presença do plasmídeo com

inserto. Como controle, foi utilizado apenas o plasmídeo sem o inserto. Em seguida, os possíveis plasmídeos recombinantes foram confirmados por meio de PCR.

2.4.2 Expressão e purificação da proteína recombinante (OMP29^{his})

Foi determinada a melhor condição de expressão de OMP29^{his}, pela análise de diferentes doses de isopropil β -D-tiogalactoside (IPTG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), em culturas incubadas em diferentes intervalos de tempo e diferentes temperaturas. Uma única colônia de *E. coli* BL21(DE) OMP29 foi inoculada em caldo LB, acrescido de canamicina (50 μ g/mL), e mantida sob agitação a 120 rpm por 16 horas a 37 °C. As células foram transferidas para novo caldo LB, e incubadas sob agitação de 250 rpm a 37 °C, até atingirem D.O._{600nm} ~1. A expressão de OMP29^{his} foi induzida pela adição de IPTG, em concentração final de 1 mM e 2 mM, seguido de incubação pelo período de 1 a 5 horas, em temperatura de 30 °C e 37 °C. A produção de OMP29^{his} foi analisada no precipitado e sobrenadante de cada uma das culturas, após corrida eletroforética em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 10% (LAEMMLI, 1970), e corado pelo Comassie Blue (Bio-Rad, CA, EUA). A melhor condição para obtenção da proteína recombinante, foi observada no precipitado de células obtidas em meio com IPTG, na concentração de 1mM, após 2 horas de incubação a 37 °C. O procedimento foi repetido em maior volume, nas condições estabelecidas. Brevemente, uma única colônia de *E. coli* recombinante foi inoculada em 10 mL de caldo LB, acrescido de 50 μ g/mL de canamicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e incubada a 37 °C por 16 horas. Em seguida, as culturas foram adicionadas em 500 mL de caldo LB e mantidas sob agitação a 250 rpm, a 37 °C, até que antigissem uma D.O._{600nm} ~1. Foi acrescentado IPTG (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) à uma concentração final de 1 mM, seguindo-se incubação sob agitação a 250 rpm por 2 horas, a 37 °C, e então o precipitado foi armazenado a -20 °C. Posteriormente, as células de *E. coli* foram ressuspendidas em 6 mM de uréia (Invitrogen) e submetidas a lise por sonicação (Ultrasonic Processor VCX 130PB, Sonics e Materials Inc, Newton, CT, EUA), seguindo 2 ciclos de 3 minutos cada e intervalos de 2 minutos em potência máxima e centrifugadas a 5.000 rpm por 15 minutos, a 4 °C. As proteínas presentes no sobrenadante foram purificadas através de cromatografia de afinidade, utilizando resina níquel quelante, conforme as instruções do fabricante (Ni-NDA, Invitrogen), a qual verifica a presença da OMP29,

a partir da detecção da cauda de histidina fusionada à proteína. Em seguida, as proteínas foram dialisadas em tampões com quantidade decrescente de uréia. As concentrações de OMP29^{his} foram mensuradas por meio do método de Bradford (1976) e analisada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 10%, assim como descrito por Laemmli (1970), e posteriormente corado pelo Comassie Blue (Bio-rad, CA, EUA). A proteína OMP29 possui o tamanho aproximado de 29 kDa e 34 kDa quando desnaturada (KOMATSUZAWA et al., 2002).

2.5 Obtenção do soro murínico policlonal anti-OMP29

Este projeto foi apreciado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Mediante a aprovação pelo referido Comitê, camundongos Balb/C foram imunizados com a proteína OMP29 recombinante purificada.

Alíquotas de 100 µL ou 200 µL de OMP29^{his} (20 µg ou 50 µg) associada ao adjuvante hidróxido de alumínio (1:1), foram inoculadas via subcutânea. A concentração dos antígenos foi alta de maneira a reduzir o volume de adjuvante inoculado e as alíquotas inoculadas foram de apenas 100 µL, divididas em dois sítios distantes de inoculação, de maneira a limitar o dano causado.

O sítio de inoculação foi monitorado para a determinação da presença de lesões. A imunização primária foi realizada pela injeção subcutânea de 100 µL com 20 µg de OMP29^{his}, e os reforços foram administrados 7 dias, 3 e 4 semanas e 6 e 7 semanas após a imunização inicial. As imunizações de reforço de 3, 4, 6 e 7 semanas, foram realizadas com 200 µL utilizando adjuvante de hidróxido de alumínio e OMP29^{his} (50 µg) e após os intervalos de 7 dias entre os ciclos de imunização, alíquotas de sangue foram coletadas da região retro orbital com pipetas Pasteur, após anestesia, nos dias 21, 42 e 63 dias após a imunização inicial.

Os soros imune e não imune (controle- antes da inoculação), foram obtidos a partir da centrifugação do sangue a 5.000 rpm por 5 minutos, a 4 °C. O título de anticorpos anti-OMP29^{his} foi determinado por Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA), e utilizado em ensaios subsequentes. A obtenção de soro ocorreu em 3 animais, para determinação da dose capaz de induzir a resposta adequada. Após a obtenção de título altos de soro anti-OMP29, os animais foram sacrificados para obtenção de maiores volumes de sangue. A

eutanásia foi feita com o dióxido de carbono em câmara de CO₂, disponível no biotério de experimentação animal do ICB II, onde foram conduzidos os experimentos, de acordo com os procedimentos estabelecidos pela Comissão de Biotérios do ICB, e supervisionado pela Biomédica Thais Marques.

2.5.1 Análise dos títulos de anticorpos IgG anti-OMP29

Os títulos de anticorpos anti-OMP29^{his} no soro de camundongos, foi determinado por ELISA.

Alíquotas de 100 µL de OMP29^{his} diluída (1 µg/mL) em tampão carbonato-bicarbonato (0,2 M; pH 9,6) foram adicionadas aos poços de placas de ELISA de 96 poços (Corning- Costar, cat. 9018, NY, EUA); seguido de incubação por duas horas em estufa a 37 °C e a 4 °C por 16 horas. A seguir, as placas foram lavadas três vezes com tampão PBS 1 X (NaH₂PO₄.H₂O 0,02M; NaCl 1,45M; Na₂HPO₄ 0,07M; pH 7,2-7,4) acrescido de 0,1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, cat. P1379, St. Louis, MO, EUA) e bloqueadas com 100 µL de solução bloqueadora (5% de leite desnatado, Molico, Brasil) em PBS/ 0,1% Tween 20, durante 30 minutos de incubação em temperatura ambiente. Após a remoção da solução bloqueadora, foram adicionados a cada poço, 100 µL de cada soro, na diluição 1:100 em PBS/0,1 % Tween 20, seguindo-se incubação a 4 °C por 16 horas. A seguir, as placas foram lavadas três vezes com PBS/ 0,1% Tween 20 e incubadas durante 30 minutos com solução a 1% de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, cat. A-4503), diluída em PBS/ 0,1% Tween 20. Os poços foram lavados três vezes com PBS/ 0,1% Tween 20 e, em seguida, foi adicionado anticorpo anti-IgG murínico conjugado com peroxidase (Sigma- Aldrich, cat.A-0170), diluído em solução de PBS/ 0,1% Tween 20. A reação foi incubada por 90 minutos, seguindo-se de lavagem por três vezes com PBS/ 0,1% Tween 20. A reação foi revelada pela adição do substrato OPD (fenilenodiamina) (Sigma-Aldrich, cat. P-8287) em tampão citrato-fosfato, 0,05 M, pH 5,0 e incubada por 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico (2,5N, Labsynth, Diadema, SP, Brasil). A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Model 680, cat. 1681000, BioRad, Tokyo, Japão), ajustado a 490 nm. Soros de camundongos não imunizados foram utilizados como controle negativo.

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism 6.0 Software Inc (La Jolla, CA, EUA), empregando o teste de variância *Two-way ANOVA* com pós-teste de *Tukey*. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

2.6 Reconhecimento de OMP29^{his} pelo soro murínico anti-OMP29^{his} e soro de indivíduo com periodontite agressiva localizada

2.6.1 Western blot

A corrida eletroforética foi realizada utilizando o gel Bolt Bis-Tris Plus (Life technologies, Carlsbad, CA, EUA) e o Bolt Mini Gel Tank (Life technologies, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, a proteína recombinante OMP29^{his} presente no gel Bolt Bis-Tris Plus foi transferida para uma membrana de nitrocelulose, por meio do kit iBlot® 2 Dry Blotting System (Life technologies, Carlsbad, CA, EUA). A membrana foi bloqueada com uma solução de 5% de leite desnatado em TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,8% NaCl e 0,1% Tween 20), por 1 hora, sob leve agitação em temperatura ambiente. Foram realizadas 3 lavagens com TBS-T, de 5 minutos cada, seguido de incubação por 2 hora com o anticorpo policlonal murínico anti-OMP29^{his}, obtido como descrito no item 2.5, ou o soro do indivíduo com periodontite agressiva localizada, o qual foi coletado em colaboração com a Profa. Dra. Luciana Saraiva de Campos do Departamento de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, a qual realiza estudo já submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana intitulado: Análise da resposta de IgG sérica contra a OMP29 e célula total de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* de diferentes sorotipos e contra célula total de *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* de pacientes portadores de Periodontite Agressiva.

Os soros foram diluídos (1:2.000) em 5% de leite desnatado em TBS-T. Após lavagens, foi utilizado o anticorpo secundário anti-IgG murínico conjugado com peroxidase (Amershan Bioscience, EUA), em diluição de 1:10.000 em TBS-T, seguindo-se incubação por 1 hora em temperatura ambiente. As bandas então foram detectadas por meio do kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, Rockford, EUA).

2.7 Interação da proteína recombinante OMP29^{his} com proteínas de matriz extracelular (pECM)

Placas de 96 poços (Corning- Costar, NY, EUA) foram recobertas em triplicata com 100 µL/poço de fibronectina celular (derivado da membrana de fibroblasto), fibronectina plasmática e seus domínios F30 e F45 (derivados de plasma humano), laminina (derivado da membrana basal de sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm de camundongo), fibrinogênio e plasminogênio (derivados de plasma humano), colágenos tipo III e V (derivados da placenta humana) na concentração de 1 µg/mL, seguindo-se incubação por 2 horas a 37 °C, e posteriormente a 4 °C por 16 horas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Placas já recobertas com 1 mg/mL de colágeno tipo I (derivado do tendão de rabo de rato) e IV (derivado de tumor de Engelbreth-Holm-Swarm de camundongo) (BD bioscience, NY, New Jersey, EUA), foram usadas sem necessidade dessa etapa inicial.

As placas foram lavadas 3 X com 300 µL/poço de PBS 1 X. Em seguida, os poços foram preenchidos com 200 µL de solução PBS/BSA [PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaHPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM) acrescido de 1% de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)], e incubados por 60 minutos em temperatura ambiente. Para as placas de colágenos I e IV (placas pré-recobertas), foi usada uma etapa adicional de cobertura com 500 µg/mL de albumina, por 1 hora.

As placas foram lavadas 3 X com 300 µL/poço de PBS 1 X. A seguir, foram adicionados 100 µL/poço de OMP29^{his} diluída em PBS, na concentração de 1 µg/mL. A placa foi lavada 3 X com 300 µL/poço de PBS 1 X. Em seguida, foram adicionados 100 µL/poço de anticorpo anti-His de camundongo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluído 1:1.000 em PBS/ BSA, para detecção de OMP29^{his}, seguido de incubação em temperatura ambiente por 60 minutos. Após lavagem, foram adicionados 100 µL/poço de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluído 1:2.000 em PBS/ BSA, seguindo-se de nova incubação por 60 minutos em temperatura ambiente. A reação foi revelada pela adição do substrato OPD (o-phenylenediamine -Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em tampão citrato-fosfato, 0,05 M, pH 5,0,

acrescido de H₂O₂ (30%), e incubação por 20 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 2,5 N.

A leitura da densidade óptica foi realizada em comprimento de onda de 490 nm em leitor de ELISA (Modelo 680, BioRad, Hercules, CA, EUA). Como controle negativo, foi utilizada fetuína para recobrir os poços, ao invés das proteínas da matriz testadas. Fetuína é uma alfa globulina embrioespecífica, altamente glicosilada (BARBOSA et al., 2006).

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram analisados com auxílio do Software GraphPad Prism, utilizando o teste *Mann Whitney* e foi considerado significantes os resultados com $p < 0,05$.

2.8 Obtenção das mutantes de *A. actinomycetemcomitans* defectivas em *omp29* e *omp29^{par}*

2.8.1 Manipulação de DNA

O DNA genômico de *A. actinomycetemcomitans* D7S-1 (cepa selvagem) foi preparado utilizando o kit QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA). O DNA plasmidial foi isolado pelo kit QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA). A transformação em *E. coli* DH5- α foi realizada por meio de eletroporação usando MicroPulser (BioRad, Hercules, CA, EUA). As enzimas de restrição, T4 DNA ligase e Taq DNA polymerase foram obtidos da New England BioLabs (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, EUA), e usados como sugerido pelo fabricante. A cadeia de reação da polimerase (PCR) foi realizada como descrito por Sambrook *et al.* (1989), e os produtos de PCR foram purificados com os kits QIAquick PCR purification e QIAquick gel extraction (Qiagen, Valencia, CA, EUA).

2.8.2 Deleção do gene sítio-específico com o sistema loxP/Cre.

A estratégia de deleção do gene por meio do sistema loxP/Cre foi previamente descrita por Sambrook et al., (1989). Resumidamente, este sistema é composto por três etapas: (1) construção do DNA doador com o cassete de resistência à espectinomicina (loxP-Sper-loxP) flanqueado pelas regiões homólogas à montante e à jusante do gene a ser deletado; (2) substituição alélica do gene alvo

de *A. actinomycetemcomitans* por meio de transformação natural; e (3) remoção do loxP-Sper-loxP deixando a cicatriz loxP na região da deleção. Desta forma, os pares de iniciadores foram desenhados para amplificar os fragmentos de DNA homólogos à montante e à jusante dos genes alvo (*omp29* e *omp29^{par}*) (Tabela 4).

Os produtos de PCR contendo as regiões homólogas à montante e à jusante dos genes *omp29* e *omp29^{par}*, bem como os sítios de restrição DRA III, foram purificados do gel após corrida eletroforética, utilizando-se o QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Valencia, CA, EUA). O cassete loxP-Spec^r-loxP foi obtido pela digestão do plasmídeo plox2/Spec^r (Tabela 1), seguindo-se de corrida eletroforética, e purificação do gel. O cassete, bem como, os amplicons, os quais também tinham sítios de restrição DRA III em ambas extremidades dos fragmentos, foram digeridos com a enzima *Dra III* (New England Biolabs, Reino Unido) a 37 °C por 1 hora e, em seguida, purificados pelo kit QIAquick PCR purification (Qiagen, Valencia, CA, EUA), e ligados a 16 °C *overnight*, por meio de T4 DNA ligase (New England Biolabs, Reino Unido), com cerca de 800 ng de cassete loxP-Spec^r-loxP e 1.600 ng dos amplicons referente à jusante e montante dos genes *omp29* e *omp29^{par}*. Posteriormente, a reação de ligação foi termicamente inativada a 65 °C por 10 minutos, e a mistura da ligação foi usada diretamente para a transformação natural na cepa de *A. actinomycetemcomitans* D7S-1, como descrito por Wang *et al.*, 2002. As colônias transformantes (com gene alvo substituído pelo cassete loxP-Spec^r-loxP) foram verificadas por PCR e designadas como mutantes com deleção “intermediária”. A etapa final consistiu na remoção do loxP-Spec^r-loxP pela introdução do vetor Cre, como descrito previamente por Sambrook *et al.* (1989).

Tabela 4- Lista de iniciadores usados para construção e complementação das mutantes de *A. actinomycetemcomitans*

Amplicons (pb)	Iniciadores	Sequências ^a	Enzimas restrição	Temperatura Anelamento
Omp29 Parálogo Up (537)	Omp29Paral-UpF	5' ACAAGCAAATATAATGAAGCACAGG 3'	-	54,4 °C
	Omp29Paral-UpR	5' <u>TTCACGTGGTGTCTCCTATATTATTAATTTG</u> 3'	<i>DRAIII</i>	
Omp29 Parálogo Dw (503)	Omp29Paral-DwF	5' <u>TACACGTGGTGT</u> TTAATTGAAGAATAAATAAG 3'	<i>DRAIII</i>	62 °C
	Omp29Paral-DwR	5' CACCACAAAAGTAGTCTTACAATCC 3'	-	
Omp29 Up (528)	Omp29-UpF	5' AAGTGTTGTCGGTACAGAGCATTG 3'	-	50,7 °C
	Omp29-UpR	5' <u>TTCACGTGGTGGATCCTCTATTAATTAGTC</u> 3'	<i>DRAIII</i>	
Omp29 Dw (610)	Omp29-DwF	5' <u>AACACGTGGTGTGTTAATTGTTAGCAAATAG</u> 3'	<i>DRAIII</i>	54,4 °C
	Omp29-DwR	5' GTTTTAAGCTCACCTTGTTGGTACATTC 3'	-	
OMP CP (1.051)	Omp CP UpF	5' <u>CAACTCGAGAAGA</u> ACTGCAATCGCATTAG 3'	<i>XhoI</i>	59,5 °C
	Omp CP DwR	5' <u>GAGGATCCTAGTACCGTTAACAGCGATTTC</u> 3'	<i>BamHI</i>	
PAR CP (1.081)	Par CP UpF	5' <u>AAACTCGAGAAAA</u> ACTGTAATCGCATTAGCTA 3'	<i>XhoI</i>	59,8 °C
	Par CP DwR	5' <u>AAGGATCCTCGTGCCGTTTACTGC</u> 3'	<i>BamHI</i>	
PKM2 (837)	PKM2-F	5' CGCGTATTGTCGGGCTATTT 3'	-	58,6 °C
	PKM2-R	5' TCCTTAGCTCCTGAAAATCTCG 3'	-	
Spec ^r (971)	Spe-DwR	5' AGCCACTGCATTTCCCGCATA 3'	-	60,9 °C
	Spe-UpF	5' CCCCTCGAGGTCGACACCAC 3'	-	
Internal Paral (1) (1.042)	Paral IntR	5' ATGAAAAAACTGTAATCGCAT 3'	-	50,3 °C
	Paral IntF	5' TTCTACACGACGGTCATC 3'	-	
Internal Paral (2) (881)	PRL IntF	5' GGCAGCACCGCAAGCAAATAC 3'	-	59,4 °C
	PRL IntR	5' CGGTAGCGGAAATTGCCTGTTG 3'	-	
Internal Omp29 (1.072)	Omp IntF	5' ATGAAAAGAACTGCAATCGCATTG 3'	-	53,1 °C
	Omp IntR	5' TTATTTAGTACCGTTAACAGCGATT 3'	-	

^aSublinhados estão os sítios de restrição.

2.8.3 Determinação da expressão das proteínas OMP29 e OMP29^{par} nas mutantes de *A. actinomycetemcomitans*

A expressão de OMP29 e OMP29^{par} nas mutantes defectivas em *omp29* e *omp29^{par}* foi analisada após corrida eletroforética em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 10% (LAEMMLI, 1970), e coloração utilizando o kit Colloidal blue stainig (Life technologies, Carlsbad, CA, EUA).

As cepas de *A. actinomycetemcomitans* AaD7S, AaΔ29, AaΔP29 e AaΔ29P29 foram inoculadas em 5 ml de caldo TSBYE (Oxoid Ltda, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ por 16 horas a 37 °C. Posteriormente, as culturas foram mensuradas e ajustadas para uma D.O._{495nm} de 0,5, e em seguida alíquotas de 1 mL destas culturas foram adicionadas em 200 mL de caldo TSBYE, as quais foram novamente incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ por 16 horas a 37 °C. Posteriormente, as culturas foram ajustadas para uma D.O._{495nm} de 0,1 (equivalente a 10⁸ células) e centrifugadas a 8.000 x g por 10 minutos, a 4 °C. Os precipitados foram ressuspensos em PBS e centrifugados novamente. As células precipitadas foram ressuspensas em tampão de carregamento (2% SDS) e as amostras foram submetidas à fervura em banho por 10 minutos, e prontamente depositadas nas canaletas do gel de poliacrilamida e submetidas à corrida eletroforética. O peso molecular esperado para a proteína OMP29 foi de 34 kDa (KOMATSUZAWA et al., 2002), já que as amostras foram aquecidas antes da corrida eletroforética, e para OMP29^{par}, o PM esperado, segundo análise com ferramentas do site www.bioinformatics.org seria de 38,44 kDa.

2.8.3.1 Isolamento de membrana externa

O volume de 200 mL de cultura *overnight*, da cepa selvagem (D7S-1) e das mutantes de *A. actinomycetemcomitans* (AaΔ29, AaΔP29 e AaΔ29P29), foram submetidas à centrifugação (8.000 x g, 10 minutos) e lavadas com PBS (10 mM fosfato, 150 mM NaCl, pH 7,4). Os precipitados resultantes foram ressuspensos em 3 mL de HEPES 10 mM, pH 7,4, contendo 1 mM de Fenilmetilsulfonilflúor (PMSF, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As membranas do envelope externo foram obtidas pela lise das células, por meio de sonicação por 5 minutos com 20%

de duração de pulso (duty) e potência 3 (output). As bactérias intactas e detritos foram coletados pela centrifugação (7.650 x g por 10 minutos). Os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos e centrifugados a 100.000 x g por 40 minutos. Os precipitados foram ressuspensos em HEPES 10 mM, pH 7,4 e novamente submetidos a centrifugação. Após ressuspensão dos precipitados em HEPES 10 mM, pH 7,4, foi adicionado N-Laurilsarcosinato de sódio (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Alemanha) até a concentração final de 1%, e as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos. Este procedimento permite a separação das membranas (FILIP et al., 1973; NIKAIDO, 1997), pois as proteínas de membrana externa são insolúveis em detergente. A mistura foi centrifugada em 15.800 x g por 30 minutos e os precipitados foram ressuspensos em HEPES 10 mM, pH 7,4, e centrifugados novamente. Os precipitados finais foram ressuspensos em HEPES 10 mM, pH 7,4, e a concentração de proteínas foi determinada pela mensuração da absorvância em espectrofotômetro ajustado em comprimento de onda de 280 nm (MINTZ, 2004). Alíquotas das suspensões de membrana externa, na concentração de 100 µg, foram acrescidas de tampão de carregamento e submetidas à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida, como descrito no item 2.8.3.

2.8.3.2 Análise proteômica por meio de espectrometria de massa

O gel de poliacrilamida SDS-PAGE foi corado utilizando o kit colloidal blue stainig (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e fotodocumentado. A seguir, foi mantido imerso em 1% de ácido acético/H₂O e enviado para a facility proteômica da Universidade do Sul da Califórnia, localizado na Faculdade Keck de Medicina. As bandas, que tinham densidade diferente entre a cepa selvagem e mutantes defectivas em *omp29* e/ou *omp29^{par}*, foram excisadas do gel, eluídas com 1% de ácido acético/H₂O e submetidas à análise por espectrometria de massa usando LTQ Orbitrap hybrid Mass Spectrometers.

2.8.3.3 Curva de crescimento de *A. actinomycetemcomitans*

As cepas de *A. actinomycetemcomitans*: AaD7S, Aa Δ 29, Aa Δ P29 e Aa Δ 29P29 foram inoculadas em ágar TSBYE, seguindo-se incubação a 37 °C, por 48 horas. As colônias bacterianas foram ressuspendidas em caldo TSBYE e as culturas incubadas por 16 horas. A D.O._{495nm} de cada uma das culturas, foi ajustada em 0,05. Uma suspensão de 380 μ L de cultura bacteriana, de cada cepa, foi depositada em poços de placas de 100 poços chamada HoneyComb plate (Bioscreen Automation for Microbiology, NJ, EUA), em duplicata, seguindo a adição de 20 μ L de óleo mineral para propiciar um ambiente com baixa concentração de oxigênio. O crescimento foi monitorado em espectrofotômetro (*Growth Reader Bioscreen C*, Oy Growth Cruves Ab Ltd., Bioscreen C Type FP-1100-C, FIN-21280 Raisio Finlândia) por 48 horas pela determinação da D.O._{420-580nm} em intervalos de 1 hora, a 37 °C, sob agitação contínua. O meio de cultura sem inoculação bacteriana foi usado como controle. Foi calculada a média da D.O._{420-580nm} das culturas em duplicata, de cada cepa e, determinada a curva de crescimento.

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism 6.0 Software Inc, empregando o teste de variância *One-way ANOVA* seguido de pós-teste de *Dunnett*. As diferenças entre os grupos, em cada tempo experimental, foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

2.8.3.4 Determinação da produção de OMP29 no extrato de membrana externa de *A. actinomycetemcomitans* por *Western Blot*

O extrato de membrana externa (item 2.8.3.1) de *A. actinomycetemcomitans* foi utilizado em ensaio de *Western Blot*, utilizando o soro anti-OMP29^{his} produzido em camundongos (item 2.5). Alíquotas de extrato de membrana das cepas: AaD7S, Aa Δ 29, Aa Δ P29 e Aa Δ 29P29, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 10% (LAEMMLI, 1970), seguindo coloração com emprego do Colloidal blue stainig kit (Life technologies, Carlsbad, CA, EUA), conforme a recomendação do fabricante. A seguir, o gel foi transferido para membrana de celulose, e esta submetida à *Western Blot*, como descrito no item 2.6.1.

2.8.3.5 Complementação das mutantes Aa Δ 29 e Aa Δ P29

O processo de complementação da deleção foi realizado para restauração dos genes *omp29* e *omp29^{par}* nas mutantes Aa Δ 29 e Aa Δ P29, respectivamente. Os genes *omp29* e *omp29^{par}* foram amplificados e engenheirados com *XhoI* na região 5' e *BamHI* na região 3' do gene (Tabela 3). Os genes foram amplificados usando a enzima Taq high-fidelity polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), ligados ao vetor pCR[®]4-TOPO[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e tratados com as enzimas de restrição *BamHI* e *XhoI* (New England Biolabs, Ipswich, MA). Os fragmentos 5'-*BamHI* -*omp29*/*omp29^{par}* -*XhoI* -3' foram purificados após eletroforese em gel (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EUA), ligados ao vetor pKM2/ItxP (Tabela 1) por meio de T4 DNA ligase (New England BioLabs (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, EUA), o qual foi tratado com as mesmas enzimas e desfosforilado usando fosfatase alcalina (Roche, Indianapolis, IN, EUA). A reação de ligação foi transformada em *E. coli* DH5- α , e colônias foram selecionadas em placas de Luria Bertani (LB) com 20 μ g/mL de cloranfenicol. Os plasmídeos contendo os genes *omp29* e *omp29^{par}* foram extraídos e confirmados por meio de PCR utilizando os iniciadores PKM2 (Tabela 4). Adicionalmente, os genes foram liberados do vetor por meio das enzimas *BamHI* e *XhoI*. Os plasmídeos foram sequenciados e transformados nas respectivas mutantes. Os vetores pKM2/*omp29* e pKM2/*omp29^{par}* foram transformados nas respectivas mutantes: Aa Δ 29 e Aa Δ 29P.

2.9 Interação de OMP29^{his} e de mutantes de *A. actinomycetemcomitans* defectivas em *omp29* e/ou *omp29^{par}* com célula epitelial gengival

2.9.1 Cultura primária e linhagem de célula epitelial gengival humana imortalizada

A linhagem de célula epitelial normal gengival imortalizada (OBA-09) (Oda e Watson, 1990), foi utilizada. Estas células epiteliais gengivais humanas (CEGH) foram isoladas a partir de tecido gengival e transfectadas com o gene do antígeno T do vírus símio 40 (SV40), usando o vetor pMT10D.

Células OBA-09 foram inoculadas em garrafas plásticas pré-revestidas com colágeno tipo I (BD bioscience, New Jersey, EUA) contendo meio queratinócito, isento de soro (KSM), contendo insulina, EGF e FGF (Invitrogen Gibcon, Invitrogen

Inc., Carlsbad, EUA) (KSFM completo) e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ (UMEDA et al., 2012). A seguir, a camada de células confluentes, em garrafa de cultura celular de 75 cm², foi removida com 5 mL de solução de tripsina sem EDTA (TrypLE™ Express, Gibcon, Invitrogen Inc. Carlsbad, CA, EUA) por 5 minutos a 37°C. Em seguida, foi adicionado 5 mL de inibidor de tripsina (Defined Trypsin Inhibitor, Gibcon, Invitrogen Inc. Carlsbad, CA, EUA), e as células foram centrifugadas a 1.200 rpm por 10 minutos, a 4 °C.

2.9.2 Ensaio de Interação bacteriana

As células epiteliais (OBA-09), na concentração de 10⁵, foram cultivadas como descrito no item 2.9.1, e adicionadas à placa de 96 poços (Corning- Costar, NY, EUA) e acrescidas de meio KSFM isento de antibiótico, seguindo-se incubação por 16 horas. As cepas AaD7S, AaΔ29, AaΔP29 e AaΔ29P29 foram cultivadas (como descrito no item 2.1.1) e, no dia em que antecedeu o experimento, as cepas foram inoculadas em caldo TSBYE e cultivadas por 16 horas. No dia seguinte, foi realizada uma diluição para obter D.O._{495nm} de 0,1 e as culturas foram incubadas por 4 horas, até atingirem o meio da fase exponencial. A cultura então foi ajustada para D.O._{495nm} ~0,3, ou seja, 2 x 10⁸ células/mL e centrifugada a 1.180 x g por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado foi ressuscitado em meio KSFM e as células bacterianas adicionadas às células epiteliais, em uma multiplicidade de infecção (*Multiplicity of infection*, MOI) de 1:1.000 (OBA-09 1x10⁵ células e *A. actinomycetemcomitans* 1x10⁸ células). Após 4 e 24 horas de co-cultura, as células foram submetidas à duas lavagens com PBS para remoção das bactérias/células epiteliais não aderentes. Para os ensaios de expressão gênica de 4 horas de interação, seguiu-se a extração do RNA utilizando o RNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), enquanto o Mini Kit Qiagen RNeasyProtocol (Qiagen; Valencia, CA, EUA) foi usado para os ensaios de expressão gênica após 24 horas de interação. A quantidade e a qualidade de RNA foram determinadas em espectrofotômetro pela mensuração da absorbância a 260 e 280 nm (Nanodrop, Wilmington, DE, EUA). A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit de transcrição reversa de alta performance (QuantiTec Reverse Transcription Kit - Qiagen; Valencia, CA, EUA) para os ensaios após interação por 4 horas, e o kit SuperScript® VILO

(Thermo Fisher Scientific, Rockford, EUA), segundo as instruções do fabricante, para os ensaios de expressão gênica de 24 horas. Em seguida, a qualidade e a quantidade do cDNA foram determinadas e as amostras armazenadas em freezer - 20 °C até o uso.

2.9.2.1 *Interação bacteriana em linhagem de célula epitelial gengival após 4 horas por PCR Array*

A expressão gênica foi avaliada utilizando o sistema PrimePCR Pathway Plate/Acute Inflammation Response H96 (Bio-Rad; Hercules, CA, EUA), um array para avaliar a expressão gênica de resposta inflamatória por meio de PCR tempo real. Foram utilizados 100 ng de cDNA resultante da expressão gênica de OBA-09, após interação de 4 horas com AaD7S, Aa Δ 29, Aa Δ P29 e Aa Δ 29P29, e seguiu-se o protocolo, de acordo com fabricante. Os níveis de transcritos de cada um dos genes avaliados (*adamA17, akt1, akt2, bax, bcl2, becn1, birc3, c3, casp3, casp8, cd14, cd74, cebpb, chuk, clu, creb1, crp, cxcl12, edn1, ep300, ets1, fas, faslg, fn1, fos, fosb, grb2, hmox1, hprt1, hras, icam1, ifng, ikbkb, IL-1 α , il-1 β , il-2, il-4, il-6, il-6st, il-8, irak1, irak2, irf1, jun, junb, map2k1, map2k2, map3k5, mapk1, mapk12, mapk14, mapk3, mif, mmp1, myd88, nfk1, nfk2, nfkbia, nos2, nr3c1, prkcq, ptgs2, rac11, raf1, rela, relb, ripkR1, serpine1, shc1, socs3, sos2, stat1, stat3, sumo1, tlr1, tlr2, tlr4, tnfrsf1a, tnfrsf1b, tp53, ubaU52, ubb, ubc, VCAM1, gdna, tbp, gapdh, hprt1, pcr, rq1, rq2 e rt*) foram expressos em valores de CT, e os valores normalizados em relação ao gene de referência gliceraldeído-3-fostato desidrogenase, *gapdh*. Em seguida, comparados de acordo com o tratamento realizado (co-cultura com AaD7S e mutantes defectivas em *omp29* e *omp29^{par}*). Os dados foram comparados com a cultura de célula acrescida da cepa AaD7S. A análise da expressão foi realizada com emprego do programa Bio-Rad CFX Manager 3.0, e resultaram em valores de “limiar” de ciclo (Cycle Threshold - CT) para cada amostra. Após o uso de método comparativo do $\Delta\Delta$ CT (PFAFFL, 2001), a análise estatística foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism 6.0 Software Inc, empregando o teste de variância *One-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Dunnett*. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

2.9.2.2 Interação bacteriana em linhagem de célula epitelial gengival após 4 horas por qRT-PCR

A expressão gênica foi avaliada utilizando iniciadores QuantiTect Primer Assay (Qiagen; Valencia, CA). Foram utilizados 100 ng de cDNA resultante da expressão gênica de OBA-09, após interação de 4 horas com AaD7S, Aa Δ 29, Aa Δ P29 e Aa Δ 29P29. Para os iniciadores selecionados, foram utilizados os kits QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen, Valência, CA, EUA), e seguiu-se o protocolo, de acordo com o fabricante. Os níveis de transcritos de cada um dos genes avaliados (*il-1 β* , *il-8*, *il-12 α* , *ptgs2*, *tnf*) foram expressos em valores de CT, e os valores normalizados em relação ao gene de referência gliceraldeído -3- fosfato desidrogenase, *gapdh*. Em seguida, foram comparados, de acordo com o tratamento realizado (co-cultura com AaD7S e mutantes defectivas em *omp29* e *omp29^{par}*). Os dados foram comparados com a cultura de célula crescida da cepa AaD7S.

Todas as amplificações foram realizadas em grades ópticas em placas de 96 poços e os dados de fluorescência foram processados usando o StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Rockford, EUA) e resultaram em valores de “limiar” de ciclo (Cycle Threshold - CT) para cada amostra. As dosagens gênicas foram obtidas por meio do método comparativo do $\Delta\Delta$ CT (PFAFFL, 2001) e a análise estatística foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism 6.0 Software Inc, empregando o teste de variância *One-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Dunnnett*. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

2.9.2.3 Interação bacteriana em linhagem de célula epitelial gengival após 24 horas por qRT-PCR

A quantificação da expressão gênica de célula epitelial OBA-09, após interação de 24 horas com as cepas AaD7S, Aa Δ 29, Aa Δ 29P e Aa Δ 29P29, foi realizada por reação de polimerase em tempo real (qRT-PCR). Foram usados 100 ng de cDNA para a reação que empregou o sistema TaqMan (Applied Biosystems), a qual consistiu em: 1 μ L de sonda Taqman e 10 μ L de TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), em um volume final de 20 μ L/reação. Os genes

avaliados foram: *il-1* (Hs 01555410_m1), *il-6r* (Hs 01075666_m1), *il-8* (Hs 00174103_m1), *il-10* (Hs 00155485_m1), *il-18* (Hs 01038788_m1), *tnf* (Hs 01113624_g1), *nod1* (Hs 00196075_m1), *nod2* (Hs 00223394_m1), *nlrp3* (Hs 00918082_m1), *trl2* (Hs 01872448_s1) e *trl4* (Hs 00152939_m1). A reação foi realizada em termociclador (Step one Plus Real-Time PCR system, Applied Biosystems), programado para as condições de amplificação: 50 °C / 2 minutos, 95 °C/ 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C/ 15 minutos e 60 °C/ 1 minuto. Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX, para correção de flutuações na leitura decorrentes das variações de volume e evaporação ao longo da reação. Os resultados, expressos em valores individuais de CT, foram transferidos para planilhas e agrupados de acordo com o tratamento realizado, e normalizados com relação aos valores obtidos para o gene de referência gliceraldeído-3-fostato desidrogenase (*gapdh* – Hs 02758991_g1).

Todas as amplificações foram realizadas em grades ópticas em placas de 96 poços e os dados de fluorescência foram processados usando o StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Rockford, EUA) e resultaram em valores de “limiar” de ciclo (Cycle Threshold - CT) para cada amostra. As dosagens gênicas foram obtidas por meio do método comparativo do $\Delta\Delta CT$ (PFAFFL, 2001) e a análise estatística foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism 6.0 Software Inc, empregando o teste de variância *One-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Dunnnett*. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

2.9.3 Interação da proteína recombinante OMP29^{his} com célula epitelial gengival (OBA-09) por qRT-PCR

Uma concentração de 10^5 células epiteliais OBA-09 (cultivadas como descrito no item 2.9.1) foram adicionadas aos poços de placas de 24 poços (Corning- Costar, NY, EUA), em meio K-SFM isento de antibiótico, e incubadas durante 16 horas. A proteína recombinante OMP29^{his} foi adicionada na concentração de 1 μ g por poço, seguindo-se incubação por 0, 2, 6, 12 e 24 horas. A seguir, as células e o

sobrenadante foram coletados. Foi realizada extração do RNA conforme as instruções do fabricante, utilizando o kit RNA extraction (Qiagen, Hilden, Alemanha). A quantidade e a qualidade de RNA foram mensurada em espectrofotômetro (Nanodrop, Wilmington, DE, EUA) e em seguida realizada a obtenção do cDNA. A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit SuperScript® VILO (Thermo Fisher Scientific, Rockford, EUA), segundo as instruções do fabricante. Em seguida, a qualidade e a quantidade do cDNA foram mensuradas em espectrofotômetro (Nanodrop) e as amostras foram armazenadas em freezer -20 °C até o uso.

A análise da expressão gênica da célula epitelial gengival (OBA-09), após interação com a proteína recombinante OMP29^{his}, foi realizada por meio do sistema taqman, utilizando os mesmos genes e método descrito no item 2.9.2.3.

Todas as amplificações foram realizadas em grades ópticas em placas de 96 poços e os dados de fluorescência foram processados usando o StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Rockford, EUA) e resultaram em valores de “limiar” de ciclo (Cycle Threshold - CT) para cada amostra. As dosagens gênicas foram obtidas por meio do método comparativo do $\Delta\Delta CT$ (PFAFFL, 2001) e a análise estatística foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism 6.0 Software Inc, empregando o teste de variância *One-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Dunnett*. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Análise filogenética baseada nas sequências de *omp29* e *omp29^{par}* e da região promotora

Todas as sequências de *A. actinomycetemcomitans* avaliadas apresentavam os genes *omp29* e o gene, por nós denominado, *omp29^{par}*. A lista das cepas avaliadas, bem como os sorotipos e números de ID, e a sua origem estão apresentados na Tabela 2. Também estão apresentadas as amostras controle *A. aphrophilus*. Esta análise permitiu mostrar que os genes *omp29* e *omp29^{par}* são

conservados em *A. actinomycetemcomitans* e distintos do gene homólogo encontrado na espécie relacionada *A. aphrophilus*.

3.1.1 Análise filogenética baseada nas sequências de *omp29* e *omp29^{par}*

A análise filogenética permitiu observar a relação entre sequências dos genes *omp29* e *omp29^{par}* e os sorotipos de *A. actinomycetemcomitans*. A análise filogenética com base na sequência de *omp29^{par}* indicou maior similaridade entre os sorotipos b e c do que com os demais, enquanto o dendrograma obtido com base na sequência de *omp29* revelou maior distância entre as cepas dos sorotipos b e c do que entre b e os demais sorotipos (Figuras 5 e 6). No entanto, foram observadas exceções com relação à filogenia com base em *omp29* e *omp29^{par}* e os sorotipos. Por exemplo, a análise filogenética das sequências de *omp29* e *omp29^{par}* permitiu alocar as cepas RHAA1, sorotipo b, isolado de macaco e SC1083, sorotipo e, em um mesmo ramo, distante filogeneticamente das demais cepas do sorotipo b isoladas de humanos.

3.1.2 Análise filogenética baseada na sequência da região promotora *omp29* e *omp29^{par}*

A análise das sequências com base na região do promotor do gene *omp29* das cepas de *A. actinomycetemcomitans*, revelou que esta região é muito conservada em amostras desta espécie, embora o sorotipo c (SCC2302_1156, D17P2_1388, AAS4A_0603 e D11S_1573), tenha mostrado uma grande variação genética em relação aos demais sorotipos. A análise filogenética baseada na região promotora de *omp29^{par}* mostrou maior heterogeneidade e foi observada grande diferença na região promotora de duas cepas do sorotipo b (SCC1398_0099 e SCC4092_0068) em relação às demais, apesar do gene *omp29^{par}* estar muito conservado entre as amostras (Figuras 7 e 8).

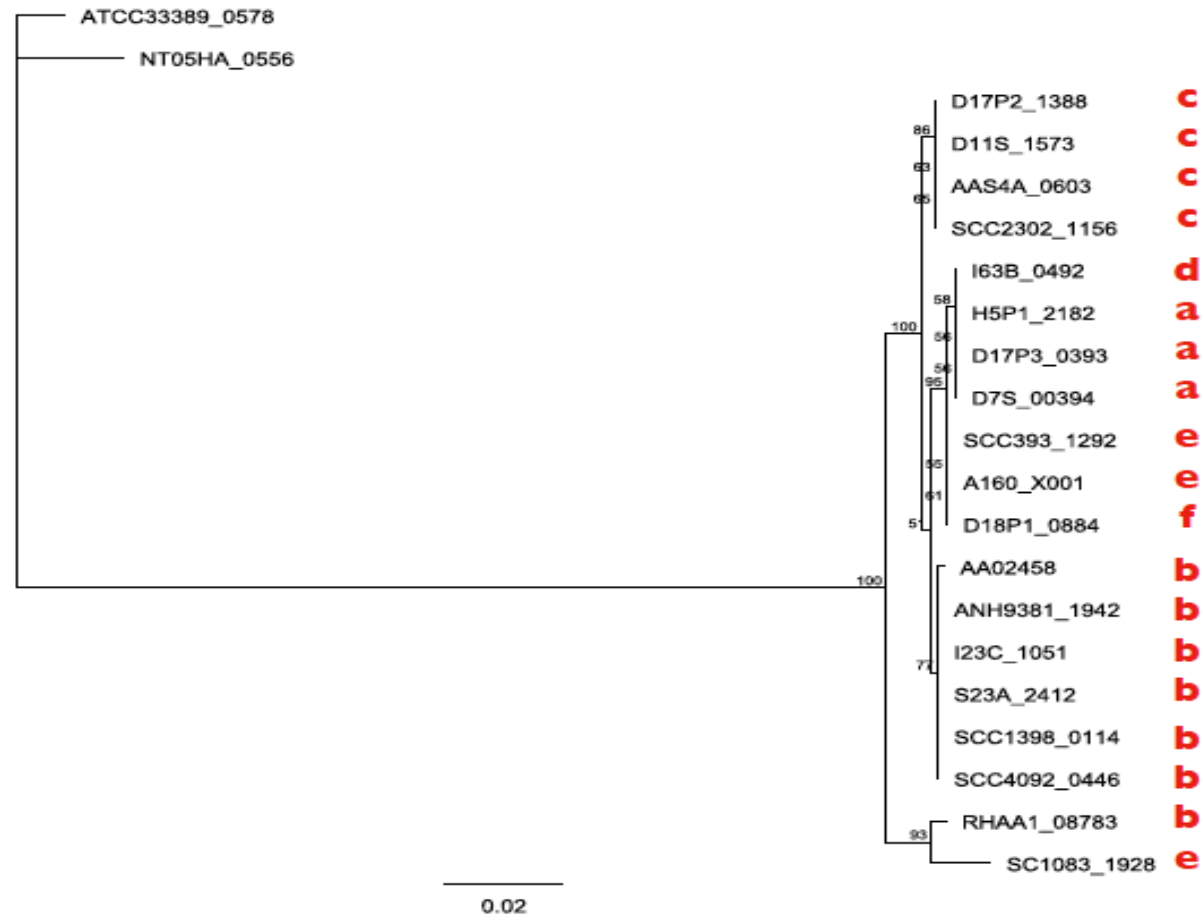


Figura 5- Árvore filogenética de *A. actinomycetemcomitans* sorotipos a, b, c, d, e e f, baseada na análise da sequência do gene *omp29*, gerada utilizando os métodos Neighbor Joining e análise da distância genética por meio do método Jukes e Cantor. Sequências de cepas de *A. aphrophilus* (ATCC 3389 e NT05HA) foram utilizadas como *outgroups*.

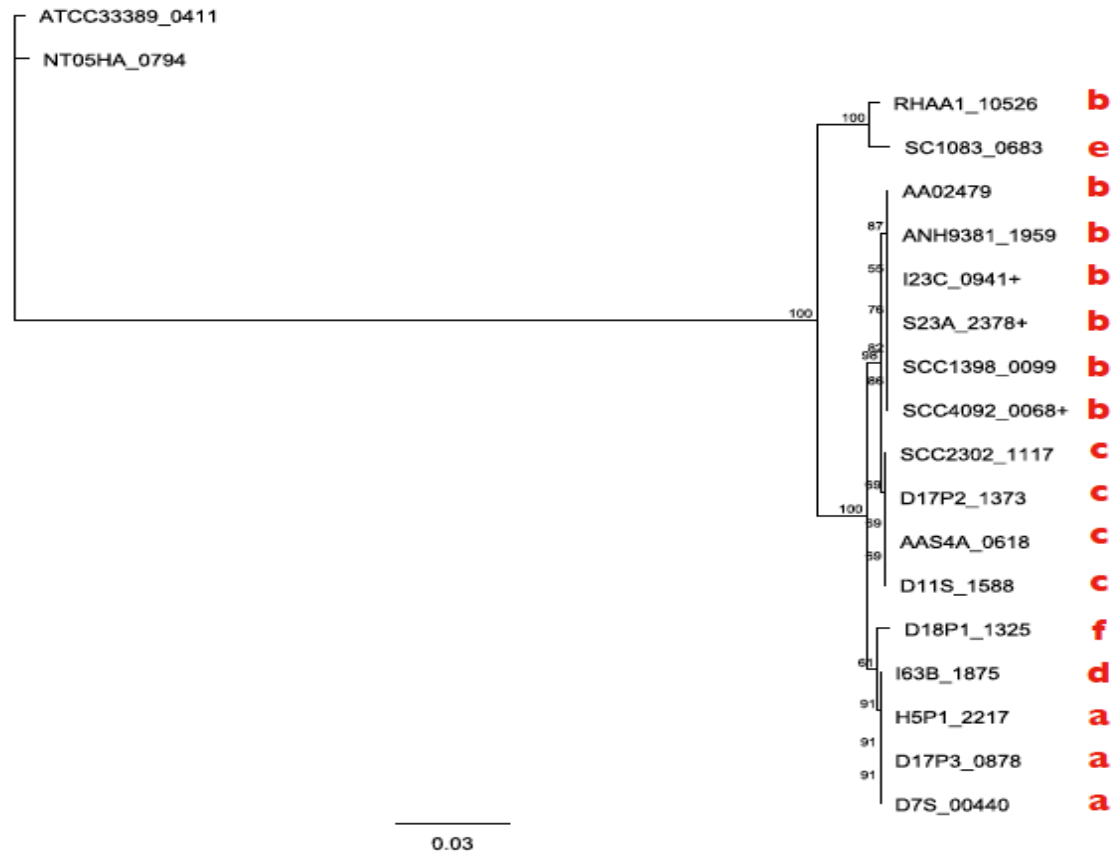


Figura 6- Árvore filogenética de *A. actinomycetemcomitans* sorotipos a, b, c, d, e e f, baseada na análise da sequência do gene *omp29^{par}*, gerada utilizando os métodos Neighbor Joining e análise da distância genética por meio do método Jukes e Cantor. Sequências de cepas de *A. aphrophilus* (ATCC 3389 e NT05HA) foram utilizadas como *outgroups*.

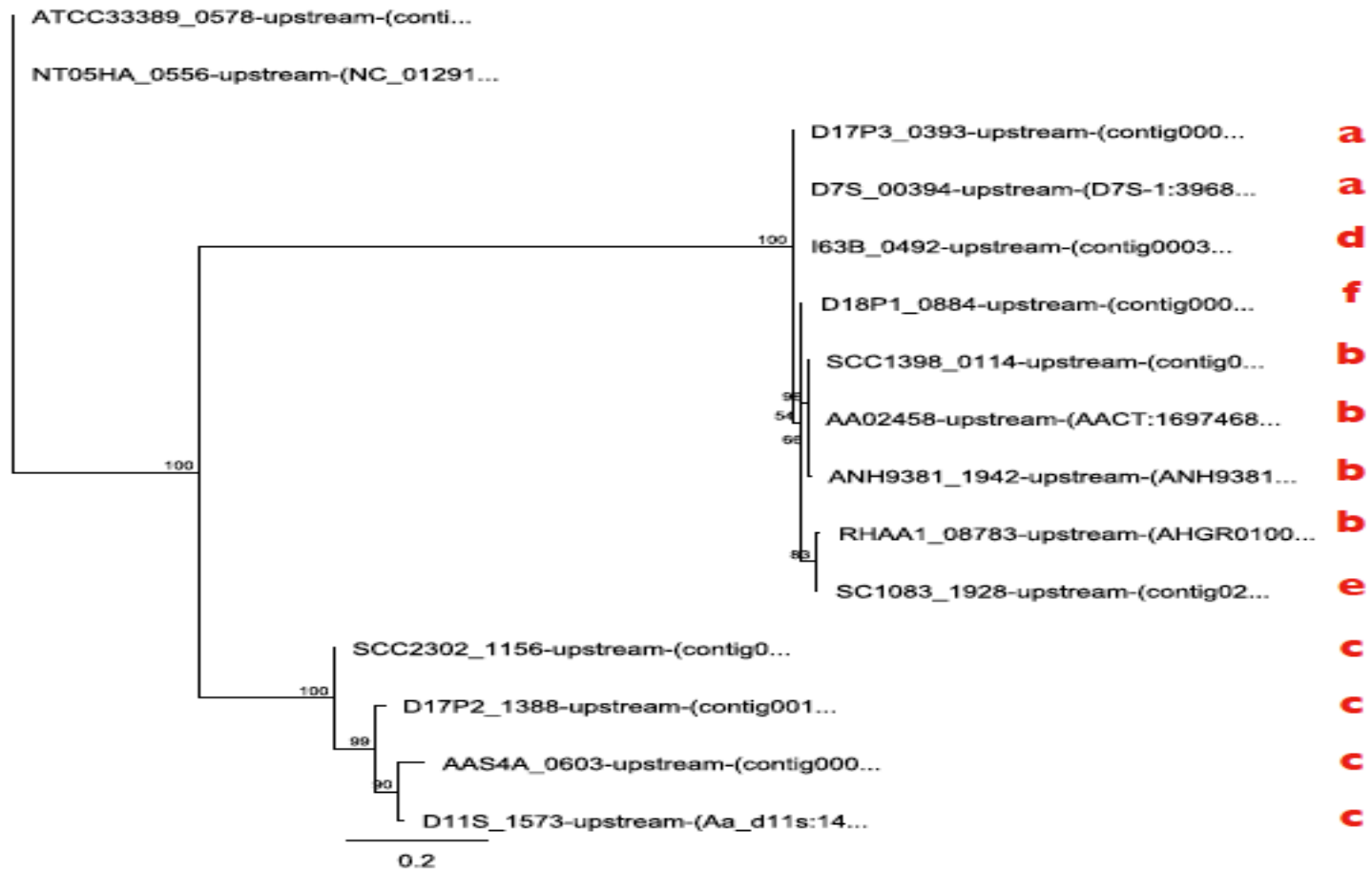


Figura 7- Árvore filogenética de *A. actinomycetemcomitans* sorotipos a, b, c, d, e e f baseada no promotor (300 pb a jusante) do gene *omp29* e gerada utilizando os métodos Neighbor Joining e análise da distância genética por meio do método Jukes e Cantor. Sequências de cepas de *A. aphrophilus* (ATCC 3389 e NT05HA) foram utilizadas como *outgroups*.

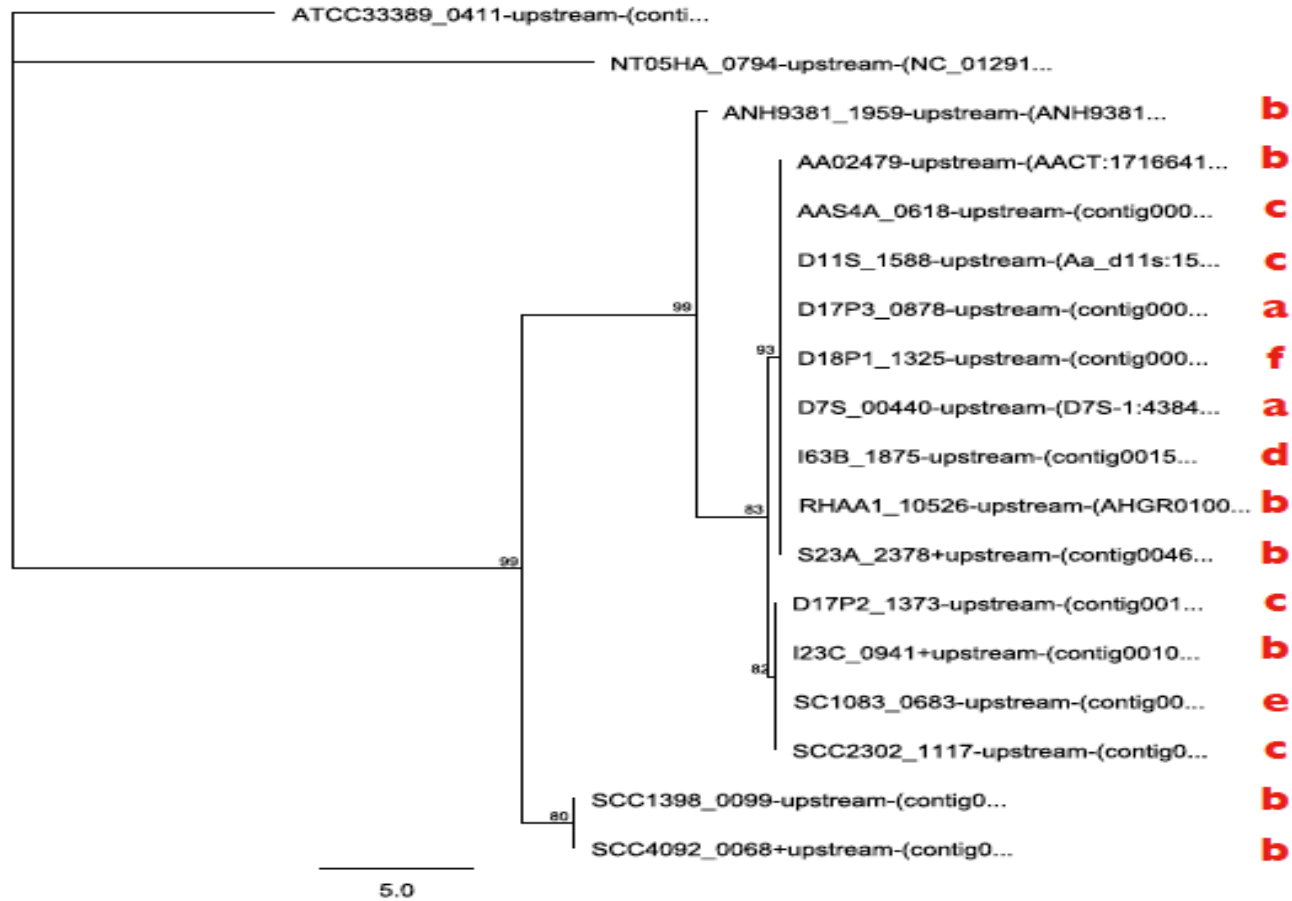


Figura 8- Árvore filogenética de *A. actinomycetemcomitans* sorotipos a, b, c, d, e e f, baseada no promotor (300 pb a jusante) do gene *omp29^{par}* e gerada utilizando os métodos Neighbor Joining e análise da distância genética por meio do método Jukes e Cantor. Sequências de cepas de *A. aphrophilus* (ATCC 3389 e NT05HA) foram utilizadas como *outgroups*.

3.2 Determinação dos níveis de transcrição relativa de *omp29* em diferentes cepas de *A. actinomycetemcomitans*

A Figura 9 representa a expressão diferencial de *omp29* nas 11 cepas de *A. actinomycetemcomitans* cultivadas em caldo TSBY-E até atingirem a fase exponencial de crescimento. Foram utilizadas as seguintes cepas: sorotipo a (707, C27-1 e C21-1), sorotipo b não JP2-like (G104-2, 194 e FDC Y4), sorotipo b JP2-like (G111-1, HK 1651 e JP2), e sorotipo c (1519 e 721). Observou-se que não houve associação da expressão relativa de *omp29* entre os sorotipos avaliados (Figura 9). Já quando as cepas são analisadas individualmente pudemos notar diferenças estatisticamente significantes (Figura 10). As cepas 707 e C21-1 apresentaram regulação positiva para *omp29*, entretanto C27-1, a qual também pertence ao sorotipo a não apresentou regulação semelhante, portanto estes dados indicam que a expressão de *omp29* pode variar entre os isolados de *A. actinomycetemcomitans*, o qual pode influenciar o potencial patogênico dos isolados.

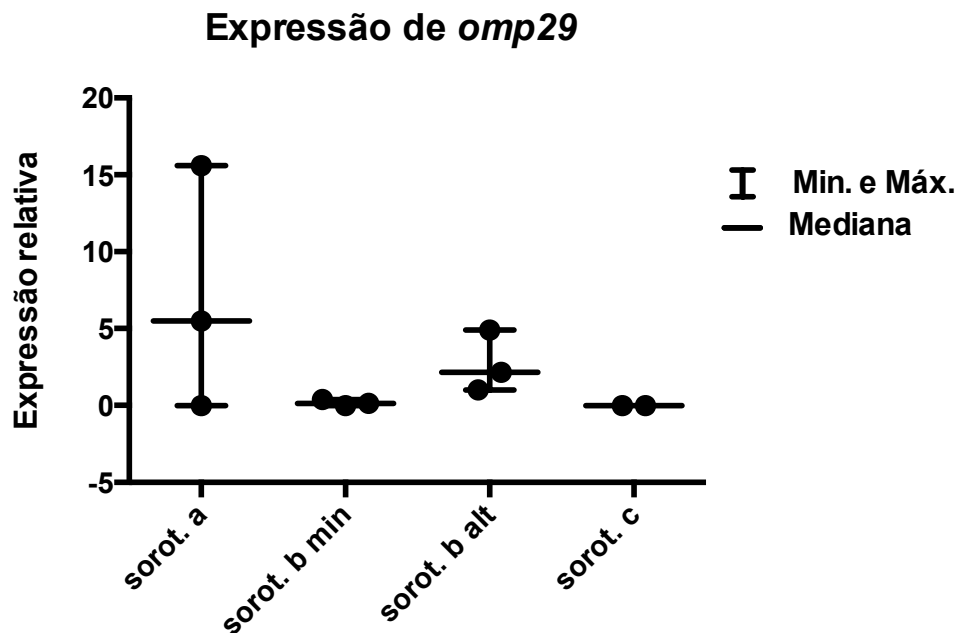


Figura 9- Análise de expressão relativa de *omp29* utilizando as cepas sorotipo a, b e c. Sorot. a representa grupo de cepas sorotipo a (707, C27-1 e C21-1), sorot. b min representam grupo de cepas sorotipo b não JP2-like (G104-2, 194 e FDC Y4), já sorot. b alt representa grupo de cepas JP2-like (G111-1, HK 1651 e JP2), sorot. c representa grupo de cepas sorotipo c (1519 e 721). As barras representam o valor mediano da expressão relativa média de cada sorotipo, além do valor mínimo e máximo. Os dados foram normalizados utilizando-se o gene *16S rRNA* como controle endógeno. * *Kruskal Wallis* seguido do pós-teste de *Dunn* (significante, $p < 0,05$).

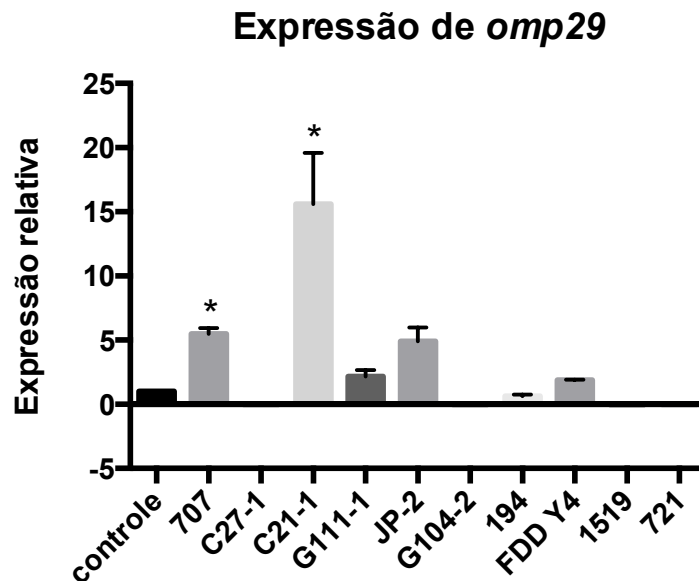


Figura 10- Análise de expressão relativa de *omp29* utilizando as cepas sorotipo a, b e c individualmente. Cepas sorotipo a (707, C27-1 e C21-1), cepas sorotipo b não JP2-like (G104-2, 194 e FDC Y4), cepas JP2-like (G111-1, HK 1651 e JP2), cepas sorotipo c (1519 e 721). As barras representam o valor mediano da expressão relativa média de cada sorotipo, além do valor mínimo e máximo. Os dados foram normalizados utilizando-se o gene *16S rRNA* como controle endógeno e foi usada a cepa HK 1651 como controle. * *One-way ANOVA* seguido do teste de *Dunnett* (significante, $p < 0,05$).

3.3 Obtenção de OMP29 recombinante

O peptídeo sinal, que direciona a proteína de membrana externa até o seu destino final, parece dificultar o processo de expressão da proteína pós-clonagem. Foi observado nos experimentos de indução da OMP29^{his} que quando a sequência do peptídeo sinal estava presente não era observada a produção da proteína, mesmo após a alteração de parâmetros como temperatura, linhagens de células hospedeiras e concentração de IPTG. Já quando a sequência do peptídeo sinal foi removida, houve expressão da proteína recombinante OMP29. Para isso, os iniciadores TOPO OMP29 (Tabela 3) foram utilizados para amplificar *omp29* de *A. actinomycetemcomitans* HK1651 contendo inicialmente o peptídeo sinal (Figura 11). Esse fragmento foi ligado ao vetor pCR[®]4-TOPO[®].

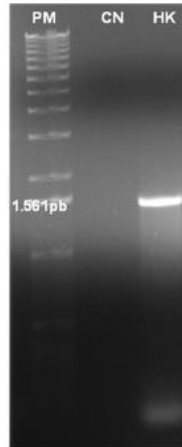


Figura 11- Fotografia do gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde produtos da reação de amplificação do gene *omp29* de *A. actinomycetemcomitans* HK1651 foram submetidos à eletroforese. Foram utilizados os iniciadores TOPO OMP29 (Forward 5' GATTTTCGGCTTTTGTAGGATA 3' e Reverse 5' ATGTTTGGCTCGGGTATTTA 3', resultando em amplicons de 1.561 pb. Coluna PM, 1 Kb Mass Ladder (Invitrogen, São Paulo, Brasil); Coluna CN, controle negativo; Coluna HK, controle positivo HK 1651.

O programa Signal 3.0 Server foi utilizado para prever qual a sequência do gene que codifica o peptídeo sinal e, baseado nesta predição, foram desenhados os iniciadores pET OMP29 com sítios de restrição BamHI e XhoI (Tabela 3) para amplificação do gene *omp29* sem o peptídeo sinal (Figura 12), o qual havia sido anteriormente ligado ao vetor pCR[®]4-TOPO[®].

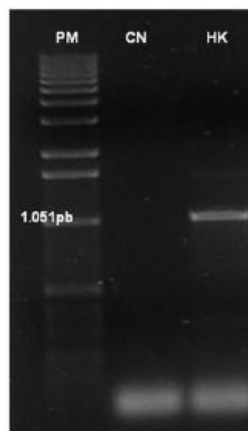


Figura 12- Fotografia do gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde produtos da reação de amplificação do gene *omp29* de *A. actinomycetemcomitans*, foram submetidos à eletroforese. Foram utilizados os iniciadores pET OMP29 (forward 5' ATGAAAAGGGATCCAATCGCATT 3' e reverse 5' AACTCGAGAATTATTTACTACCG 3', resultando em amplicons de 1.051 pb. Coluna PM, 1Kb Mass Ladder (Invitrogen, São Paulo, Brasil); Coluna CN, controle negativo; Coluna HK, controle positivo HK 1651.

O produto de amplificação de *omp29* sem o peptídeo sinal foi novamente ligado ao vetor pCR®4-TOPO® e este transformado em *E. coli* DH5- α . O vetor pTOPOomp29SPS foi extraído, digerido com as enzimas de restrição (*Bam*HI e *Xho*I) e o fragmento de *omp29* sem o peptídeo sinal foi purificado após eletroforese em gel de agarose. O vetor pET28B também foi submetido à digestão com as mesmas enzimas seguido de procedimento de purificação (Figura 13).

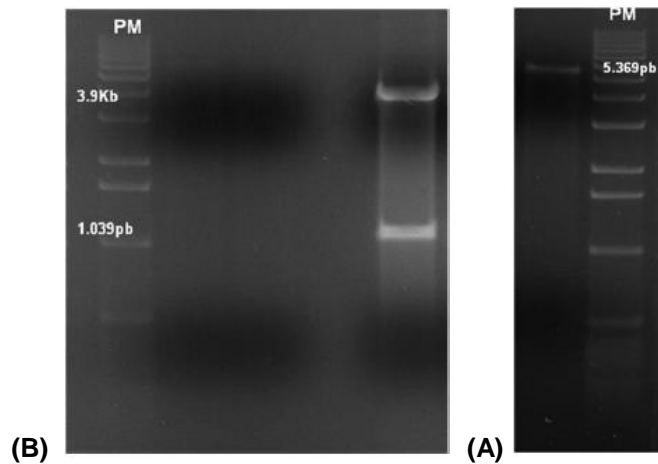


Figura 13- Fotografia do gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde mostram os produtos da reação de digestão do vetor pTOPOomp29SPS: pCR®4-TOPO® (3.9 kb) + *omp29* sem peptídeo sinal (1.039 pb) (**Figura A**) e digestão do vetor pET28B (**Figura B**), foram submetidos à eletroforese. Foram utilizados as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I. Em (PM) 1 Kb Mass Ladder (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

Em seguida, os fragmentos que codificam a OPM29 e o vetor pET28B linearizado foram ligados e transformados em *E. coli* BL21 (DE). Verificou-se a presença de 3 clones que albergavam o plasmídeo com inserto, quando estes foram comparados com o controle, o qual possuía o plasmídeo pET28B sem o inserto (Figura 14). Em seguida, foi realizada a confirmação da identidade dos insertos dos 3 clones por meio de PCR com os iniciadores pET OMP29 (Figura 15) e por sequenciamento utilizando os iniciadores: T7 universal: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3' e T7 Terminator: 5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3, os quais amplificam parte do promotor T7 do vetor pET28B (Figura 15) e permitiram mostrar que o gene estava no quadro de leitura correto (Figura 16).

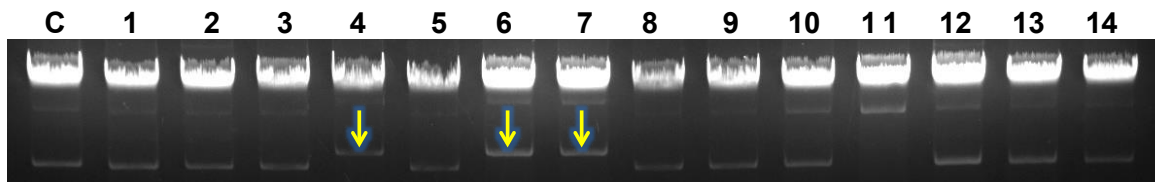


Figura 14- Fotografia do gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os plasmídeos extraídos foram submetidos à eletrorese, para verificação da presença do inserto. Como controle foi utilizado apenas o plasmídeo sem o inserto (C) e os números representam os plasmídeos de 14 clones. Os clones 4, 6 e 7 (indicados pela seta) apresentam plasmídeos recombinantes.

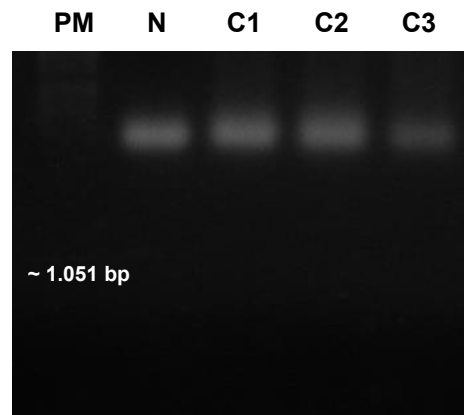


Figura 15- Fotografia do gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde produtos da reação de amplificação do gene *omp29*, foram submetidos à eletrorese. Foram utilizados os iniciadores pET OMP29 (*forward* 5' ATGAAAAGGGATCCAATCGCATT 3' e *reverse* 5' AACTCGAGAATTATTTACTACCG 3'), resultando em amplicons de 1.051 pb. Coluna PM, 1Kb Mass Ladder (Invitrogen, São Paulo, Brasil); Coluna N, controle negativo; C1, C2 e C3, representam amplicons dos clones 4, 6 e 7 (Figura 14).

```

1 TAT ACC ATG GGC AGC AGC CAT CAT CAT CAT CAT CAC AGC
40 AGC GGC CTG GTG CCG CGC GGC AGC CAT ATG GCT AGC ATG
79 ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CCA ATC GCA TTA
118 GCT ATC GCT GGT TTA GCA GCA GCA ACA GTA GCA CAG GCA
157 GCA CCA CAA GCA AAC ACT TTC TAT GCT GGT GCA AAA GCC
196 GGT TGG GCT TCG TCT CAT CAC GGA TTA AAT CAA TTT AAA
235 CAG AAA GGA GTT TCT ATA AAT CGT AAC TCT GAG GCT TAC
274 GGC GTT TTC GGT GGT TAT CAA ATT ACA GAT AAC TTC GCT
313 GTT GAA GCA GGT TAT GAA TAT TTT GGA CGT TCT AAG GCT
352 AAA GTT AAT GGT GCT CAA CGC TTT AGA CAT ACT GCT CAT
391 GGT ACA ACT TTA GCC CTT AAG GCA AGT TAT CCT GTA TTG
430 GAC AAC TTA GAT GTT TAT GGA CGT GTT GGC GCC GCT TTA
469 ATT CGT AGT GAT TAT AAA GTT GGT CAA GCC AAT AAA CCT
508 GAT AGA TAT CAC AAT TTG AAA GTA TCT CCG GTT TTT GCC
547 GGT GGT GTT GAG TAT GCC ATT CTT CCT GAA CTG GCA TTA
586 CGA GCA GAA TAT CAA TGG GTT AGC CGT GTA GGT AAC TTA
625 GGC CGT GCA GAA GAA AAA GCC GAC CGT TCT GCA CGT ACA
664 ATT GAT TAT TCA CCG GAC ATC GGT TCT GTA GCA GTT GGC
703 TTG TCT TAC CGT TTC GGT CAA GGT GTA GCG CCT GCT CCG
742 GCT CCT GAA GTT GTA AGA AAG ACA TTC AGT TTG AAC TCT
781 GAT GTA ACT TTC GCA TTC GGT AAA GCT AAC TTA AAA CCA
820 CAA GCA CAA AAC ACA TTA GAT GGC ATC TAC GGC GAA ATC
859 GCT CAA GTG AAC AAT GCT AAT GTT CAA GTT GCA GGT TAT
898 ACA GAC CGT ATC GGT TCC GAC GCT TAC AAC CAA AAA TTA
937 TCT CAA AGA CGT GCT GAA ACT GTA GCA AAC TAC CTT GTA
976 TCT AAA GGT GTT TCT CAA CAA GCC ATC TCT GCT ACC GGT
1015 CAC GGT AAA GCA AAT CCG GTT ACC GGT AAC AAA TGC GAC
1054 GTA GTT AAA GGT CGT AAA GCG CTT ATC GCT TGT TTG GCT
1093 GAT GAC CGT CGC GTA GAA ATC GCT GTT AAC GGT ACT AAA
1132 TAA

```

Figura 16- Sequenciamento para confirmação do gene *omp29* no quadro de leitura do vetor pET28B. A sequência de nucleotídeos mostra, em verde, o fragmento do gene *omp29* sem o peptídeo sinal; em azul, parte do fragmento do vetor pET28B; em amarelo, o códon de início do pET28B; em vermelho, o sítio de restrição *BamHI* e, em azul, o códon de parada do gene *omp29*. Foi utilizado o iniciador T7 universal e T7 terminator para condução da análise.

Após a confirmação da identidade do inserto de *omp29*, a expressão de OMP29^{his} foi induzida, sendo o cultivo na presença de 1 mM IPTG a 37 °C a partir de 2 horas (Figura 17A) a melhor condição de indução. A proteína foi purificada e, desta forma, foi possível observar a banda única de OMP29^{his} de cerca de 37 kDa (Figura 17B), como esperado após aquecimento (KOMATSUZAWA et al., 2002).

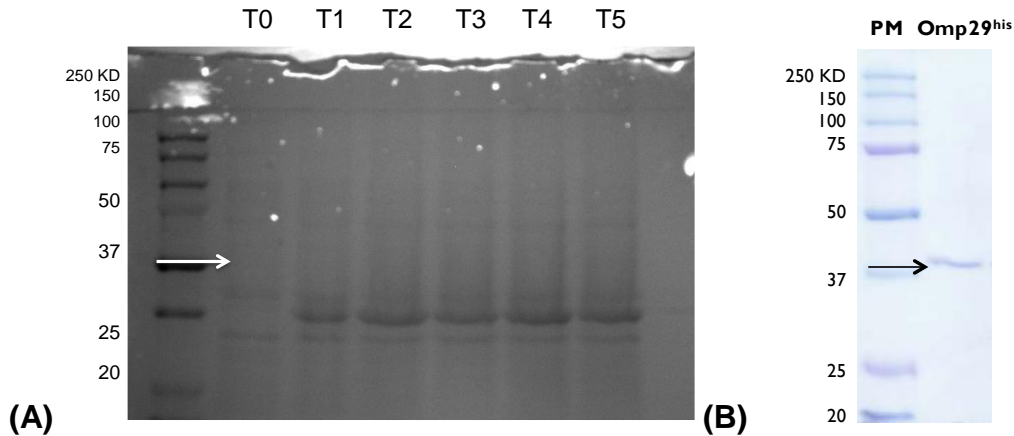


Figura 17- Gel de poliacrilamida 10% SDS-Page de alíquota das culturas de *E. coli* recombinante, após a indução da expressão de OMP29^{his} com 1 mM de IPTG por 5 horas. PM: marcador de peso molecular (Precision Plus Protein, Bio-Rad) em kDa. **(A):** Precipitado em todos os tempos. A seta indica banda correspondente a OMP29^{his} aquecida, com aproximadamente 37 kDa. **(B):** Proteína OMP29 purificada (Omp29^{his}) aquecida com aproximadamente 37 kDa.

3.4 Obtenção de soro murínico policlonal anti-OMP29

Este ensaio foi realizado para obtenção de soro anti-OMP29^{his}. Os camundongos Balb/c foram inicialmente imunizados via subcutânea com a proteína OMP29 recombinante purificada na concentração de 20 µg, com adjuvante em volume de 100 µl. O título de anticorpos anti-OMP29^{his} foi baixo após a injeção inicial. Em função disso, injeções de reforço após 2 semanas foram administradas com 50 µg de OMP29^{his}, em um volume de 200 µl com administração de reforços adicionais após 7 dias, 3, 4, 6 e 7 semanas. Os soros dos camundongos inoculados com OMP29^{his}, apresentaram títulos altos de anticorpos anti-OMP29, a partir de 42 dias da imunização primária (Figuras 18, 19 e 20).

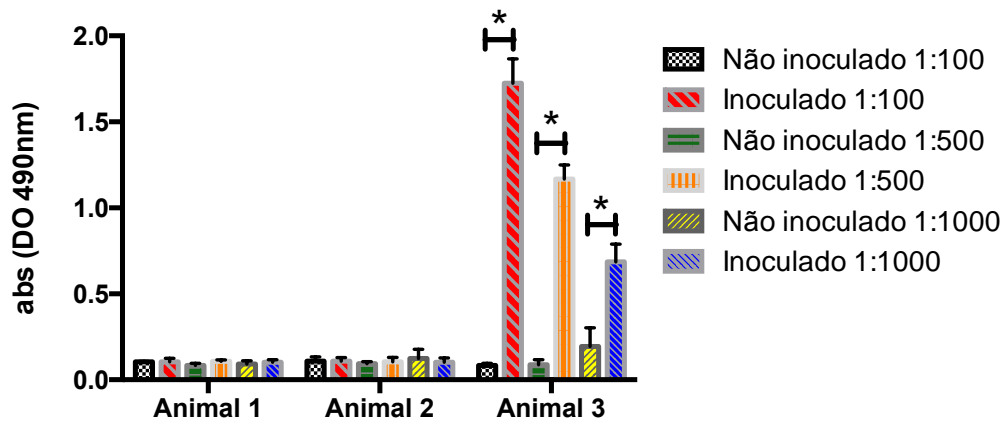


Figura 18- Dados de D.O._{490nm} em ensaio de ELISA 21 dias após imunização primária com 20 µg, usando diferentes concentrações de soro de camundongos imunizados contra OMP29^{his} e controles não imunizados. * *Two way ANOVA* seguido de pós-teste de *Tukey*, $p < 0,0001$ para animal 3 na diluições 1:100, 1:500 e 1:1.000.

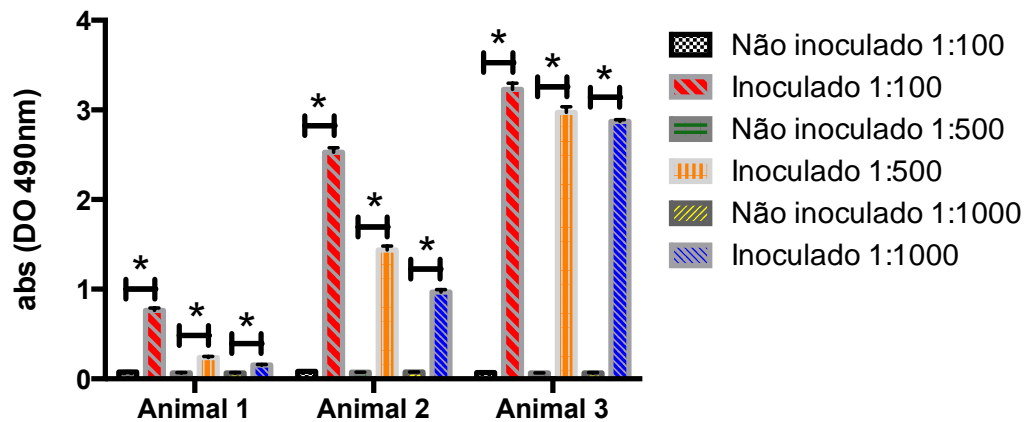


Figura 19- Dados de D.O._{490nm} em ensaio de ELISA 42 dias após imunização primária e reforço de 50 µg ao 21º dia, usando diferentes concentrações de soro de camundongos imunizados contra OMP29^{his} e controles não imunizados. * *Two way ANOVA* seguido de pós-teste de *Tukey*, $p < 0,0001$ para os animais 2 e 3 nas diluições 1:100, 1:500 e 1:1.000, $p < 0,0001$ para o animal 1 nas diluições 1:100 e 1:1500 e $p < 0,05$ para a diluição 1:1.000.

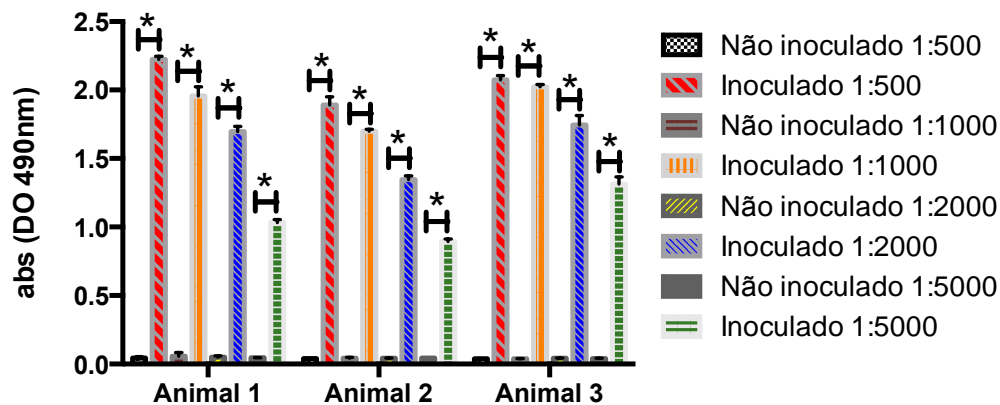


Figura 20- Dados de D.O._{490nm} em ensaio de ELISA 63 dias após imunização primária e reforço de 50 µg ao 42º dia, usando diferentes concentrações de soro de camundongos imunizados contra OMP29^{his} e controles não imunizados. * *Two way ANOVA* seguido de pós-teste de *Tukey*, $p < 0,0001$ para os animais 2 e 3 nas diluições 1:100, 1:500 e 1:1.000, $p < 0,0001$ para o animal 1 nas diluições 1:100 e 1:1500 e $p < 0,05$ para a diluição 1:1.000.

3.4.1 Reconhecimento de OMP29^{his} pelo soro murínico anti-OMP29^{his} e soro de indivíduo com periodontite agressiva localizada

A proteína recombinante OMP29^{his} apresenta um PM próximo de 37 kDa, a qual difere da proteína nativa (29KDa) ou 34KDa quando aquecida, já que OMP29^{his} possui cauda de histidina fusionada (6 aminoácidos). A cauda de histidina, presente na região N-terminal do vetor pET28B, fusiona-se à proteína recombinante durante a expressão do vetor, e é útil no processo de purificação por meio de cromatografia de afinidade.

A proteína OMP29^{his} foi reconhecida em ensaio de *Western blot* pelo soro policlonal IgG anti-Omp29^{his} e pelo soro de um indivíduo com periodontite agressiva localizada colonizado por *A. actinomycetemcomitans*. Desta forma, demonstramos que a proteína recombinante foi corretamente construída (Figura 21).

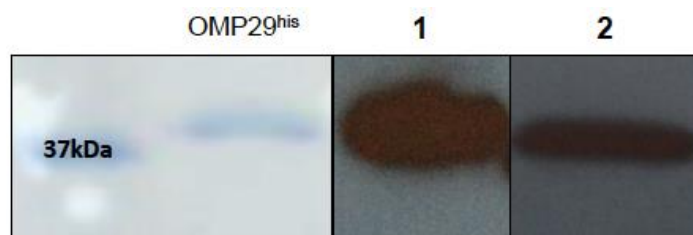


Figura 21- Gel de poliacrilamida 10% SDS- Page de alíquota da proteína recombinante Omp29^{his}. (1) Detecção de OMP29^{his} usando soro policlonal anti-OMP29^{his} por meio de *Western blot*. (2) Detecção de OMP29^{his} usando soro do indivíduo com periodontite agressiva localizada.

3.5 Interação da proteína recombinante OMP29^{his} com proteínas da matriz extracelular (pECM)

A proteína OMP29^{his} de *A. actinomycetemcomitans* (AaOMP29^{his}) parece ter uma ligação específica à fibronectina, já que os dados apresentados na Figura 22, mostraram que AaOMP29^{his} teve interação estatisticamente significativa com a fibronectina plasmática e celular, quando comparadas ao controle negativo (fetuína). A laminina e o fibrinogênio apresentaram uma tendência de interação entretanto sem diferença estatística. As proteínas plasminogênio, colágenos tipo I, III, IV e V não apresentaram interação com AaOMP29^{his}, quando comparados com o controle negativo. Embora, as análises tenham mostrado interação com a fibronectina, os

domínios testados F30 e F45, não mostraram interação com AaOMP29^{his}, F30 não interagiu e F45 teve uma ligação não expressiva.

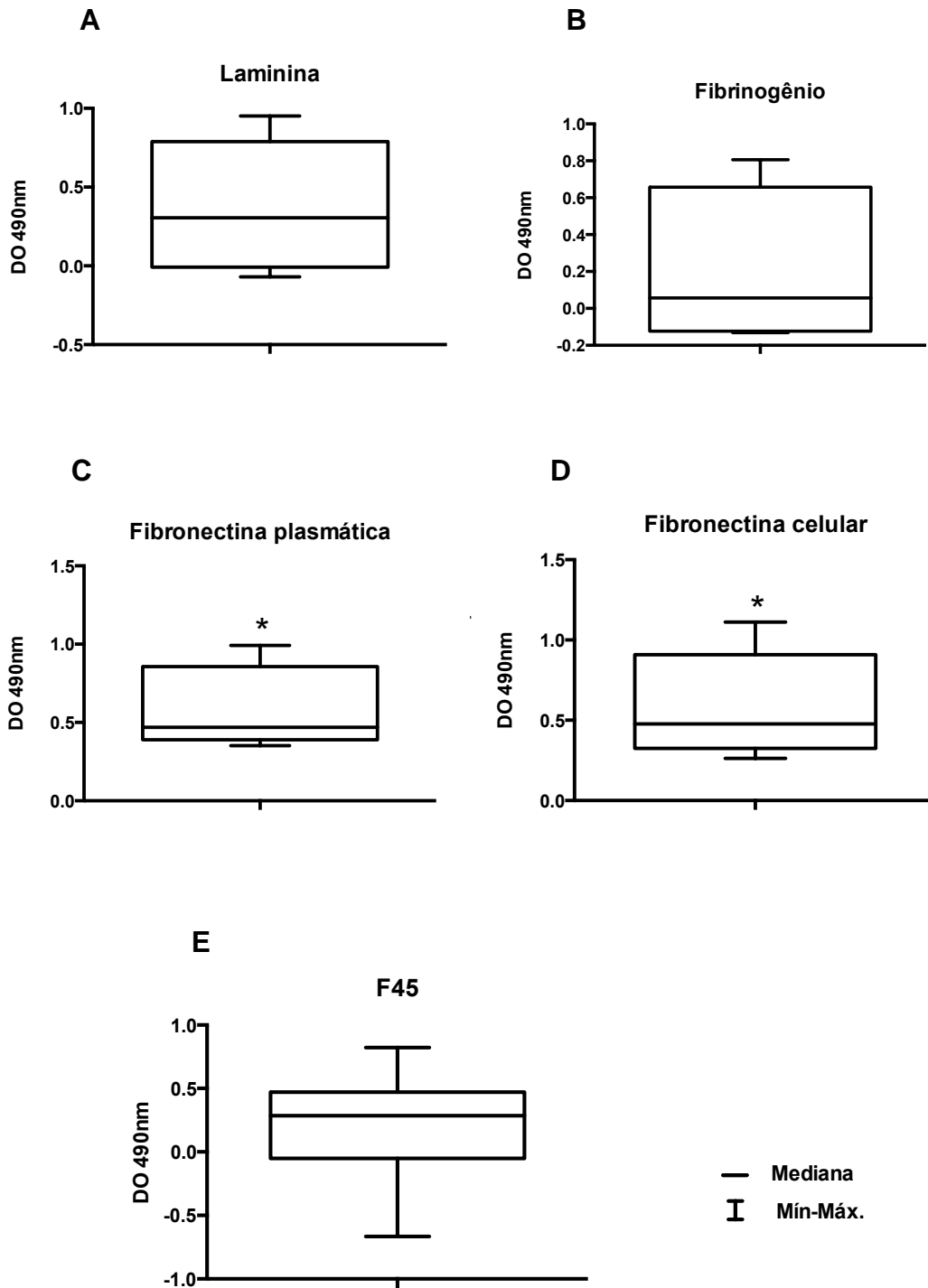


Figura 22- Dados de D.O._{490nm} em ensaio de ELISA para análise da interação de OMP29^{his} com as proteínas de matriz (laminina **(A)**, fibrinogênio **(B)**, fibronectina plasmática **(C)** e celular **(D)** e o seu domínio F45 **(E)**. Os valores apresentados são as diferenças obtida após a subtração e comparação com controle negativo (fetuína). * *Mann Whitney* (significante, $p < 0,05$).

3.6 Obtenção das mutantes de *A. actinomycetemcomitans* defectivas em *omp29* e *omp29^{par}*

Após a construção do DNA doador com o cassete de resistência à espectinomicina (loxP-Spec^r-loxP) flanqueado pelas regiões homólogas à montante e à jusante dos genes *omp29* e *omp29^{par}* foi realizada substituição alélica do gene alvo, etapa que denominamos de mutante intermediária. Em seguida, realizou-se a remoção do loxP-Spec^r-loxP deixando a cicatriz loxP na região da deleção e esta etapa foi denominada de mutante final. Para confirmar o sucesso na obtenção das cepas mutantes finais AaΔ29 e AaΔ29P realizou-se reações de PCR utilizando iniciadores que anelam-se à jusante e à montante dos genes alvo representada pela Figura 23 e sequenciamento representada pela Figura 24.

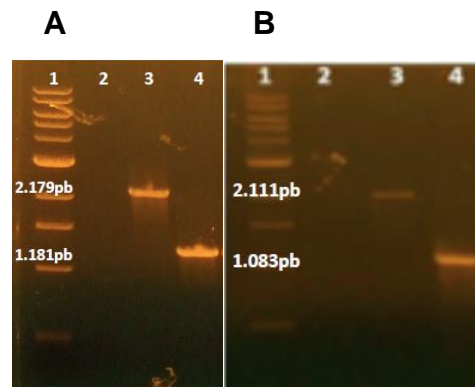


Figura 23- Fotografia do gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde produtos de PCR usando como molde DNA extraído da cepa selvagem e das mutantes finais AaΔ29 e AaΔ29P foram submetidos à eletroforese. **(A)** Coluna (1), 1Kb Mass Ladder (New EnglandBiolabs- UK). Colunas (2) e (3), controle negativo com água destilada e controle positivo (AaD7S), respectivamente. Coluna (4), amplicons obtidos usando como molde DNA da mutante final AaΔ29. Foram utilizados para esta reação os iniciadores Omp29-UpF e Omp29-DwR (Tabela 4). O tamanho dos amplicons esperados para a cepa selvagem (AaD7S) e para a mutante final de *omp29* são 2.179 pb e 1.181 pb, respectivamente. **(B)** Coluna (1) 1Kb Mass Ladder (New EnglandBiolabs- UK) e Colunas (2) e (3) controle negativo com água destilada e controle positivo (AaD7S), respectivamente. Colunas (4), amplicons obtidos usando como molde DNA da mutante final AaΔ29P. Foram utilizados para esta reação os iniciadores Omp29Paral-UpF e Omp29Paral-DwR. O tamanho dos amplicons esperados para a cepa selvagem (AaD7S) e para a mutante final de *omp29^{par}* (AaΔ29P) são: 2.111 pb e 1.083 pb, respectivamente.

A

1	TAAGTCTACA	AGGAGACACT	GGGGAACCAT	TTTTTAAACG	AGGTAGTATT
51	TGCATGACGC	TTTATTAGTT	AGAGCGGTAG	AAAGTAACCG	AATCTTAACA
101	CACAAATGCA	GAATATTGTC	AGTAGAAAAA	GGCAAATAAA	TATTAATTTT
151	ACTGAATAAA	TTCTTAAGAT	TGGTTGATTA	GTGAACTAGA	AAGATGTTGG
201	GTTGTTTAAA	AAACAATCAA	AAAAACTTAA	GTTGTTTGAT	TTTTGGCTTT
251	TTAGTAGGAT	AATGTCTGAA	CTTTTAAACA	GTCATTTTCA	AAGGGATATG
301	TATTTGTTAA	AAGTATATGG	GGTGAATTCA	ACTTCGTATT	AAACAATATC
351	TTAGTTCGTT	AATTGTAATA	AATTTCACTT	TTTTACTTAA	ACGGTTTAAG
401	ATAACAGGTA	ACACAAGTCC	TTGTGTTGGT	TTTCAGCTGT	ATCGGCTGAT
451	ACTGTTTTAA	ATTAAAGATG	ACTAATTAAT	AGAGGATCCA	CCACGTGGAT
501	CCATAACTTC	GTATAAGATC	TGCTATACGA	AGTTATGTCG	ACACGTGGTG
551	TGTTAATTGT	TAGCAAATAG	AGATAATAAA	GACCTGAACG	AAAGTTTAGG
601	TCTTTTTTTA	TGTAGTCAGA	TTTAATAATA	AGGAATGAAA	AATAGCTTAT
651	TTTAATCGCA	GTTGTTGTGA	TTGTGGCAGT	CACGTTTATT	CCAGCTGAAT
701	GAAGCATTAC	CCCAAACCTT	GCCGCCCTAA	TGGATAAGGC	GAGGACGTTT
751	TGGTAGTAGC	CGGTAAATAC	CCGAGCCAAA	CATTCAGGCC	TTTATTGGTG
801	GGGAAAATTG	TTTGTGATAC	AATACGCGCG	TTTTTTTCCT	TCAATGAACA
851	CAAGGAACGT	TATGGAAACT	TTAGATAAAA	TCAAAAAACA	AATTAGCGAA
901	AACCCCATTC	TTATTTACAT	GAAAGGTTTCG	CCGAAATTCC	CGTCTTGCGG
951	TTTTCCGCC	GCGCGGTTGA	GCCTTAATTA	ATTGCGGTGT	GCGTTCGGTT
1001	ATGTGGATAT	TTACACACCG	GACATTCGTG	CCGAAATTAC	CGGCTTATGC
1051	CAACTGACGA	CATCCCGCAA	TAATGGTGGA	AGGTAGCTCA	TCGGTGGTGC
1101	GACATCGTGT	TGAATGTAC			

B

1	TATGCGCAGC	ATTAATAAAA	GGTAGGCGAG	TTGTTAGATA	TCGGTCAGGG
51	TGCCAATCAG	AAAGCCAAAG	CCAATAAACA	ACGTGGAAAA	ACGGTGGCAG
101	AACCGACCGC	ACTTTATACA	ACGCTGAAAT	CACCGAAAGA	ATATCAGCAA
151	CAAATTAAGA	AACTGGAGCA	GCAAATGTAT	AAATTTGCAC	AGGATTTGGA
201	ATTTGAGAAA	GCTGCTGCAA	CGCGCGATCA	GTTACAACAA	TTACGGGAAA
251	GTTTTATGTT	ATCAAGTGAG	TAAAATTTCA	TATAAAAAGC	AACAAAGGAA
301	AGTTGGTTAT	ATTGATCTGA	AAAATAAGCG	GAATTTGATT	TTTTATTTTT
351	TTATAGGATA	ATACTAAAGC	TTTAGCATTT	TATTTTAAAT	AAAGGACTGA
401	ATTTACCCAA	ATAAAGCGGT	TCAATTTGCC	TTTAGTTAAA	TTAAAATCTT
451	AAGTTAGCAT	ATTTTAAGTT	AATCAAATTA	ATAATATAGG	AGACACCACG
501	TGTCGACATA	ACTTCGTATA	GCAGATCTTA	TACGAAGTTA	TGGATCCACG
551	TGGTGTTTAA	TTGAAGAATA	AATAAGTAAT	AAATCTGCAT	GCTGTGAAGT
601	ATGCAGATTT	TTTTATCTCT	TTTTTCAGAA	AATAGGCCAT	GAAAAACACC
651	TGATTTTTTG	ACCGCACTTT	ATAGCAATAG	CGTGCTTATA	AAAAGTAAAA
701	GAGCGAAAAA	TTCGCCCTTG	TATTTATTTT	TATTGCAGAT	TATTGCACCA
751	GTAAATAGAA	GTTACTATCG	CCACGAATAA	TGTTCAAGGC	AACGGCAGAC
801	GGTTTTTTAT	CTAACTCTTT	GCGCAGTTGT	CCGAGATTTT	CTATTTTCTG
851	GCGATTGATT	CCGATAATCA	CATCACCGGT	TTTTAAACCA	CGTTGTTCTG
901	CCAAAGAACC	GGTTTTTATT	TTGCCACAG	ATACGCCTTT	AAGCCTTTTT
951	CGTCGTAATT	ATTTAATTCC	GCGCCGTCTA	GTGCAAGGAG	CAAATTGCCG
1001	GCACTGGTTT	GGATTTTTCA	TCGATGAGCC	CTACTTAGTT	GTTTTTGG

Figura 24- Sequenciamento para confirmação das mutantes finais Aa Δ 29 e Aa Δ 29P. **(A)** A sequência de nucleotídeos mostra, em verde, o fragmento localizado a montante; em azul, o fragmento localizado a jusante do gene *omp29*; em vermelho, a cicatriz LoxP decorrente da recombinação e remoção do gene; em amarelo, os sítios de restrição DRA III. Foi utilizado o iniciador Omp29-UpF para condução da análise. **(B)** A sequência de nucleotídeos mostra, em verde, o fragmento localizado a montante e em azul fragmento localizado a jusante do gene *omp29^{par}*; em vermelho, a cicatriz LoxP decorrente da recombinação e remoção do gene; em amarelo, os sítios de restrição DRAIII. Foi utilizado o iniciador Omp29Paral-UpF para condução da análise.

A partir da cepa Aa Δ 29 final foi obtida a cepa contendo a dupla mutação em *omp29* e *omp29^{par}*, entretanto, não foi removido o cassete de resistência à espectinomicina da *omp29^{par}*. Essa cepa foi também confirmada por procedimento de PCR (Figura 25) e sequenciamento (Figuras 26 e 27), conforme descrito anteriormente.

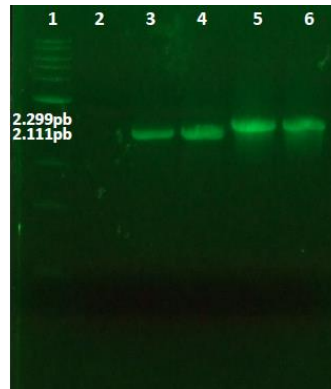


Figura 25- Fotografia do gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde produtos de PCR da mutante com deleção em *omp29* e *omp29^{par}* foram submetidos à eletroforese. Coluna (1) 1 Kb Mass Ladder (New England Biolabs- UK). Colunas (2), controle negativo com água destilada; coluna (3 e 4) controle positivo (AaD7S); colunas (5 e 6) mutante Aa Δ 29 final com mutação intermediária em *omp29^{par}*, utilizando os iniciadores para *omp29^{par}* (1): Omp29Paral-UpF e Omp29Paral-DwR. O tamanho dos amplicons esperados para a cepa selvagem (AaD7S) e Aa Δ 29P intermediária são respectivamente: 2.111 e 2.299 pb.

```

1  TATGCCGCAG  CATTAATAAA  AAGGTAGGCG  AGTTGTTAGA  TATCGGTCAG
51  GGTGCCAATC  AGAAAGCCAA  AGCCAATAAA  CAACGTGGAA  AAACGGTGGC
101  AGAACCGACC  GCACTTTATA  CAACGCTGAA  ATCACCGAAA  GAATATCAGC
151  AACAAATTAA  GAAACTGGAG  CAGCAAATGT  ATAAATTTGC  ACAGGATTTG
201  GAATTTGAGA  AAGCTGCTGC  AACGCGCGAT  CAGTTACAAC  AATTACGGGA
251  AAGTTTTATG  TTATCAAGTG  AGTAAAATTT  CATATAAAAA  GCAACAAAGG
301  AAAGTTGGTT  ATATTGATCT  GAAAAATAAG  CGGAATTTGA  TTTTTTATTT
351  TTTTATAGGA  TAATACTAAA  GCTTTAGCAT  TTTATTTTAA  ATAAAGGACT
401  GAATTTACCC  AAATAAAGCG  GTTCAATTTG  CCTTTAGTTA  AATTAANAATC
451  TTAAGTTAGC  ATATTTTAAG  TTAATCAAAT  TAATAATATA  GGAGACACCA
501  CGTGTCGACA  TAACCTTCGTA  TAGCATCAT  ATACGAAGTT  ATGATAATTC
551  GATGACGGTA  TCGATAAGCT  TGATAATTCC  TGCAGCCCAT  GCAAGGGTTT
601  ATTGTTTTCT  AAAATCTGAT  TACCAATTAG  AATGAATATT  TCCCAAATAT
651  TAAATAATAA  AACAAAAAAA  TTAATAAAGT  GTTCCACCA  TTTTTTCAAT
701  TTTTTTATAA  TTTTTTTAAT  CTGTTATTTA  AATAGTTTAT  AGTTAAATTT
751  ACATTTTCAT  TAGTCCATTC  AATATTCTCT  CCAAGATAAC  TACGAACTGC
801  TAACAAAATT  CTCTCCCTAT  GTTCTAATGG  AGAAGATTCA  GCCACTGCAT
851  TTCCCACAAT  ATCTTTTGGT  ATGATTTTAC  CCGTGTCCAT  A

```

Figura 26- Sequenciamento para confirmação da mutante Aa Δ 29P29. A sequência de nucleotídeos mostra em verde o fragmento localizado a montante, em azul, o cassete de resistência à espectinomicina; em vermelho, os sítios *LoxP*; em amarelo, os sítios de restrição *DRAIII*. Foi utilizado o iniciador Omp29Paral-UpF para condução da análise.

```

1  AACCAGTGCC GGCATTTGCT CCCTGCACTA GACGGCGCGG AATTAAATAA
51  TTACGACGAA AAAGGCCTTA AAGGCGTATC TGTGGGCAA ATAAAAACCG
101  GTTCTTTGGC AGAACACGT GGTTTAAAAA CCGGTGATGT GATTATCGGA
151  ATCAATCGCC AGAAAATAGA AAATCTCGGA CAACTGCGCA AAGAGTTAGA
201  TAAAAACCG TCTGCCGTTG CTTTGAACAT TATTCGTGGC GATAGTAACT
251  TCTATTTACT GGTGCAATAA TCTGCAATAA AAATAAATAC AAGGGCGAAT
301  TTTTCGCTCT TTTACTTTTT ATAAGCACGC TATTGCTATA AAGTGCGGTC
351  AAAAAATCAG GTGTTTTTCA TGGCCTATTT TCTGAAAAAA GAGATAAAAA
401  AATCTGCATA CTTACACAGCA TGCAGATTTA TTACTTATTT ATTCTTCAAT
451  TAAACACCAC GTGGATCCAT AACTTCGTAT AAGATCTGCT ATACGAAGTT
501  ATGATAATTC CTGCAGGTCG ATTTTCGTTC GTGAATACAT GTTATAATAA
551  CTATAACTAA TAACGTAACG TGACTGGCAA GAGATATTTT TAAAACAATG
601  AATAGTTTAA CACTTACTTT AGTTTTATGG AAATGAAAGA TCATATCATA
651  TATAATCTAG AATAAAATTA ACTAAAATAA TTATTATCTA GATAAAAAAT
701  TTAGAAGCCA ATGAAATCTA TAAATAAACT AAATTAAGTT TATTTAATTA
751  ACAACTATGG ATATAAAATA GGTACTAATC AAAATAGTGA GGAGGATATA
801  TTTGAATACA TACGAACAAG TTAATAAAGT GAAAAAATA CTTCGGAAAC
851  ATTTAAAAAA TAACCTTATT GGTACTTACA TGTTTGGATC AGGAGTTGAG
901  AGTGGACTAA AACCAATAG TGATCTTGAC TTTT

```

Figura 27- Sequenciamento para confirmação da mutante Aa Δ 29P29. A sequência de nucleotídeos mostra, em verde, o fragmento localizado a jusante; em azul, o cassete de resistência à espectinomicina; em vermelho, os sítios LoxP; em amarelo, os sítios de restrição DRAIII. Foi utilizado o iniciador Omp29Paral-DwR para condução da análise.

As cepas mutantes foram confirmadas fenotipicamente por ensaios de eletroforese em gel de SDS-PAGE, por espectrometria de massa e *Western Blot*. Após a eletroforese com gel de SDS utilizando proteínas de membrana externa, a ausência da expressão das proteínas codificadas pelos respectivos genes deletados para Aa Δ 29, Aa Δ 29P e Aa Δ 29P29, pôde ser observada. A mutante Aa Δ 29 revelou aumento de expressão de OMP39 e OMP29^{par} em relação à cepa selvagem. Assim como a mutante Aa Δ 29, a mutante dupla Aa Δ 29P29 mostrou aumento da expressão de OMP39 (Figura 28).

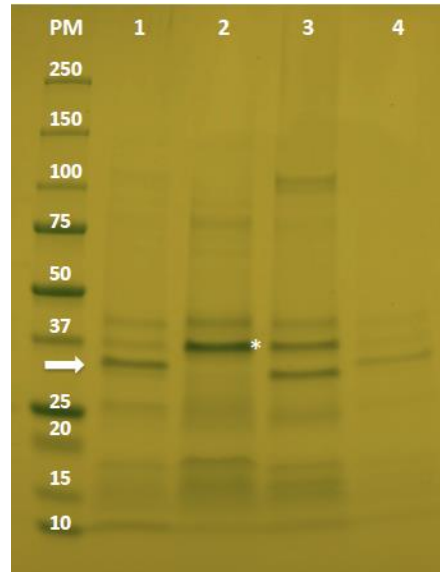


Figura 28- Fotografia de Gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE, onde alíquotas de membrana externa isoladas de culturas das mutantes de *A. actinomycetemcomitans* defectivas em *omp29* e *omp29^{par}* e de cepa selvagem AaD7S (D7S-1), foram submetidas à eletroforese após crescimento *overnight*. PM: marcador de peso molecular (Precision Plus Protein, Bio-Rad) em kDa; Coluna (1) AaD7S, cepa selvagem; Coluna (2) AaΔ29P29; Coluna (3) AaΔ29; Coluna (4) AaΔ29P. A seta indica banda correspondente a OMP29 (após aquecimento) com aproximadamente 34 kDa e o asterisco a banda correspondente à OMP39.

Para demonstrar que as mutantes não estavam expressando OMP29 e/ou OMP29^{par}, foi realizada análise proteômica por meio de espectrometria de massa, a qual avaliou a identidade das bandas excisadas do gel de SDS (Figura 28) e foi confirmada novamente a identidade das mutantes. Quando *omp29* e *omp29^{par}* foram removidos simultaneamente (AaΔ29P29), houve uma maior expressão de Omp39, com aumento de 11 vezes em relação à cepa selvagem. A mutante AaΔ29 mostrou uma maior expressão de OMP39 e OMP29^{par} quando comparada com o tipo selvagem, de 2 e 7 vezes, respectivamente. A expressão de OMP29 e OMP39 na mutante AaΔ29P não variou quando comparada à cepa selvagem.

As diferenças na expressão de OMP39 e OMP29^{par}, quando há a ausência da expressão de OMP29, sugere um mecanismo compensatório no intuito de manter a integridade da membrana externa da bactéria. Por outro lado, os dados sugerem que a deleção de *omp29^{par}* não promoveu alterações no perfil de proteína, mostrando que OMP29 é uma das principais proteínas da membrana externa, ao passo que os dados sugerem que *omp29^{par}* seria um gene de substituição. Por outro lado, a análise proteômica demonstrou que há uma produção simultânea de OMP29 e OMP29^{par} na cepa do tipo selvagem (D7S-1).

A expressão de OMP29 nas mutantes defectivas em *omp29* e/ou *omp29^{par}* foi analisada por *Western Blot*, à sua maior sensibilidade que a análise em gel SDS-PAGE, usando soro policlonal anti-OMP29^{his}, como descrito no item 2.6.1 (Figura 29 B). A análise do extrato de membrana das mutantes AaΔ29 e AaΔ29P29 indicaram que estas não produzem OMP29, e que OMP29 foi produzida pela mutante AaΔ29P, indicando que o soro utilizado é específico para OMP29. Desta forma, pôde-se ratificar uma vez mais a veracidade das mutantes.

A análise por *Western Blot* também confirma que proteína recombinante OMP29^{his} foi corretamente construída, já que o soro anti-OMP29^{his} reagiu contra a proteína OMP29 nativa de *A. actinomycetemcomitans*. A proteína OMP29^{par}, cuja banda tem peso molecular levemente menor que 34 kDa (quando aquecida) na cepa selvagem (D7S), não pôde ser observada por *Western Blot* (Figura 29 B). Apesar da alta homologia entre as duas proteínas OMP29 e OMP29^{par}, não ficou claro se OMP29^{par} pode ser reconhecida pelo soro policlonal anti-OMP29, já que OMP29^{par} apresentou-se como uma banda tênue na mutante AaΔ29, e não pode ser distinguida na AaD7S (selvagem), já que a proximidade das bandas OMP29 e OMP29^{par} faz com que estas apresentem-se como uma única banda.

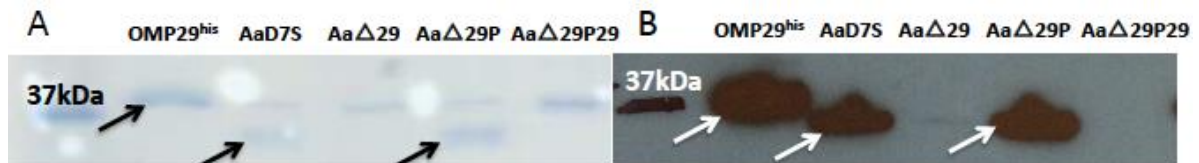


Figura 29- (A) Gel de poliacrilamida 10% SDS-Page, onde alíquotas da proteína recombinante OMP29^{his} e membrana externa isolada de culturas das mutantes de *A. actinomycetemcomitans* (AaΔ29, AaΔ29P e AaΔ29P29) e da cepa selvagem (AaD7S), foram submetidas à eletroforese após crescimento *overnight*. (B) Análise da indução de OMP29 na superfície de *A. actinomycetemcomitans* por meio de *Western blot*, utilizando o soro IgG anti-OMP29 contra OMP29^{his}, e extrato de membrana externa de *A. actinomycetemcomitans* (mesma ordem da figura A). AaD7S, AaΔ29 (banda tênue) e AaΔ29P reagiram contra o soro IgG anti-OMP29 e não contra a membrana da mutante AaΔ29P29. A propriedade termo-modificável de OMP29 resultou em um padrão de migração, gerando uma banda na altura de 34 kDa. As setas indicam as bandas referentes a OMP29^{his} e a proteínas OMP29 das cepas AaD7S e AaΔ29P.

3.6.1 Complementação dos genes deletados

Após amplificação de *omp29* e *omp29^{par}*, ligação no vetor pCR[®]4-TOPO[®] e transformação em *E. coli* DH5-α, foram obtidas colônias recombinantes para *omp29*

e *omp29^{par}*. Após confirmação da identidade das colônias, foi selecionada uma colônia para cada gene. Os plasmídeos recombinantes foram extraídos da *E. coli* DH5- α , digeridos e os fragmentos excisados do gel de agarose, após corrida eletroforética (Figura 30 A). Os fragmentos *omp29* e *omp29^{par}* foram então ligados ao vetor pKM2/ltxP resultando nos vetores pVT1642/*omp29* e pVT1642/*omp29^{par}*, respectivamente e transformados em *E. coli* DH5- α . Após identificação das recombinantes por PCR, os plasmídeos foram extraídos e digeridos para confirmar a clonagem dos genes ao vetor (Figura 30 B).

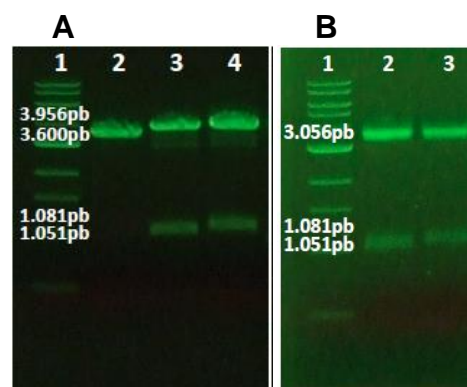


Figura 30- Fotografias de gel de agarose (1%) em tampão TAE. **(A)** produtos da digestão do vetor pKM2/ltxP e do vetore TOPO ligado a *omp29* e a *omp29^{par}*, foram submetidos à eletrorese. Coluna (1), 1Kb Mass Ladder (New EnglandBiolas- UK). Colunas (2), vetor pKM2/ltxP; Coluna (3), vetor TOPO ligado a *omp29*; Coluna (4), vetor TOPO ligado a *omp29^{par}*. Foram utilizados as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I para todas as amostras e o tamanho para o vetor pKM2/ltxP, TOPO e para os genes *omp29* e *omp29^{par}* são respectivamente: 3.6 Kb, 3.956 pb, 1.051 pb e 1.081 pb. **(B)** produtos da digestão dos vetores pKM2/ltxP ligado a *omp29* e a *omp29^{par}* foram submetidos à eletrorese. Coluna (1), 1Kb Mass Ladder (New EnglandBiolas- UK). Colunas (2), vetor pKM2/ltxP ligado a *omp29*; Coluna (3), vetor pKM2/ltxP ligado a *omp29^{par}*. Foram utilizados as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I para ambas amostras e o tamanho para o vetor pKM2/ltxP e para os genes *omp29* e *omp29^{par}* são respectivamente: 3.956 pb, 1.051 pb e 1.081 pb.

Os vetores pVT1642/*omp29* e pVT1642/*omp29^{par}* foram sequenciados e transformados nas mutantes Aa Δ 29 e Aa Δ 29P (Figuras 31 A e 31 B).

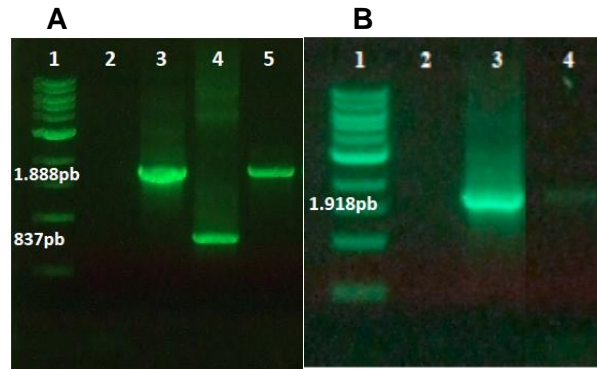


Figura 31- Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE. **(A)** Produtos de PCR da mutante de AaΔ29 complementada, foram submetidos à eletroforese. Coluna (1), 1Kb Mass ladder (New EnglandBiolas-UK). As colunas (2-3), controle negativo com água destilada e controle positivo (vetor pVT1642/*omp29*), respectivamente. A coluna (4), controle positivo (pVT1642); Coluna (5), AaΔ29 complementada. Foram utilizados os seguintes iniciadores: PKM2 F 5' CGCGTATTGTCGGGCTATTT 3' e PKM2 R (5' TCCTTAGCTCCTGAAAATCTCG 3') e o tamanho dos fragmentos amplificados para pVT1642 e pVT1642/*omp29* são: 837 e 1.888 bp. **(B)** Produtos de PCR da mutante de A. AaΔ29P complementada, foram submetidos à eletroforese. Coluna (1), 1Kb Mass ladder (New EnglandBiolas-UK). As colunas (2-3) controle negativo com água destilada e controle positivo (vetor pVT1642/*omp29*), respectivamente. A coluna (4), AaΔ29P complementada. Foram utilizados os seguintes iniciadores: PKM2 F 5' CGCGTATTGTCGGGCTATTT 3' e PKM2 R 5' TCCTTAGCTCCTGAAAATCTCG-3' e o tamanho do fragmento amplificado para pVT1642/*omp29^{par}* é: 1.918 bp.

Os lisados de células totais das mutantes complementadas ou não, e do tipo selvagem (AaD7S), foram submetidos à eletroforese em SDS-Page, e o perfil de proteínas determinado. Como pode ser observado na Figura 32, apesar de apresentarem os plasmídeos codificando os genes deletados, não houve expressão da proteína nas cepas complementadas.

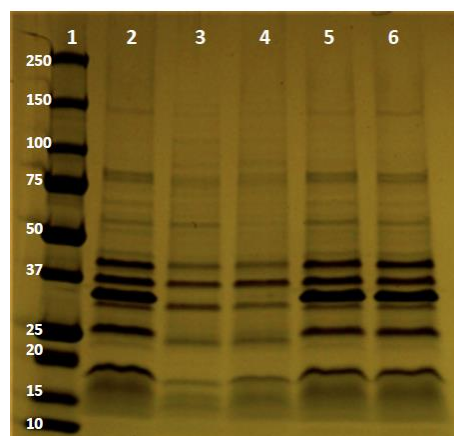


Figura 32- Gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE, onde alíquotas de célula inteira de *A. actinomycetemcomitans* defeitiva em *omp29* e/ou *omp29^{par}* e seus isolados complementados, e o isolado do tipo selvagem (AaD7S), foram submetidos à eletroforese após o crescimento *overnight*. Coluna (1) Marcador de peso molecular (Precision Plus Protein, Bio-Rad) em kDa; Coluna (2) AaD7S, controle positivo; Coluna (3) AaΔ29; Coluna (4) mutante AaΔ29 complementada; Coluna (5), AaΔ29P; Coluna (6) AaΔ29P complementada.

3.7 Interação de OMP29^{his} e de mutantes de *A. actinomycetemcomitans* defectivas em *omp29* e/ou *omp29^{par}* com célula epitelial gengival

3.7.1 Curva de crescimento de *A. actinomycetemcomitans*

Para realizar os ensaios de co-cultura com células epitelial gengival (OBA-09) foi avaliado inicialmente o perfil de crescimento das cepas de *A. actinomycetemcomitans* no intuito de avaliar discrepâncias no crescimento que poderiam influenciar tais ensaios. A análise da curva de crescimento da cepa selvagem e mutantes defectivas em *omp29* e/ou *omp29^{par}* mostra que AaΔ29P29 apresentou um crescimento maior em comparação com AaΔ29, AaΔ29P e o tipo selvagem (AaD7S) (Figura 33). Essa diferença, estatisticamente significativa ($p < 0,05$), iniciou-se a partir do tempo 12 horas e manteve-se até 48 horas. Ressalta-se também que a ausência de OMP29 ou OMP29^{par} não gerou um efeito negativo para a velocidade de crescimento das mutantes em relação à cepa selvagem.

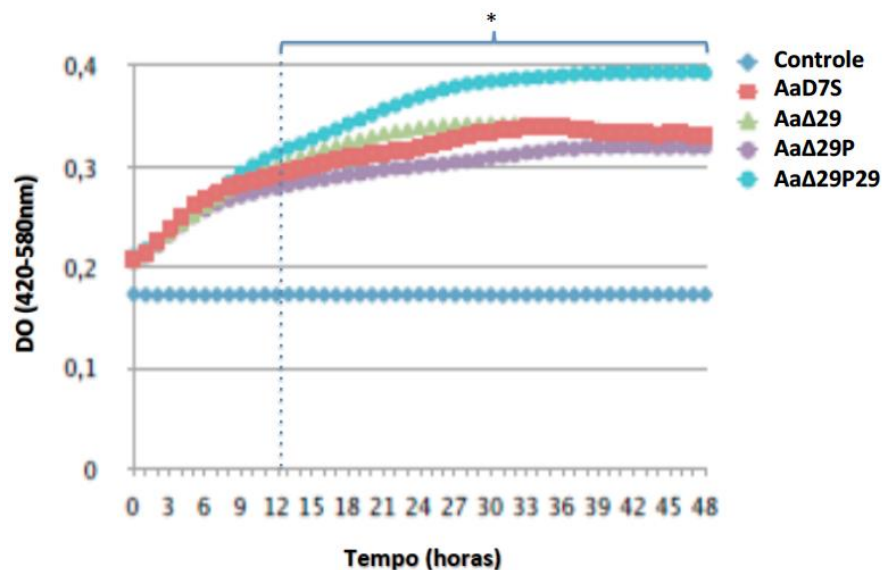


Figura 33- Curva de crescimento de cepas de *A. actinomycetemcomitans* defectivas em *omp29* e/ou *omp29^{par}* (AaΔ29, AaΔ29P e AaΔ29P29). Foi usado controle positivo e negativo, AaD7S e meio de cultura TSBYE não inoculado, respectivamente. * *One-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Dunnnett* (significante, $p < 0,05$).

3.7.2 Interação bacteriana em linhagem de célula epitelial gengival após 4 horas por PCR Array

A expressão gênica das células epiteliais OBA-09 em co-cultura com a cepa selvagem de *A. actinomycetemcomitans* D7S-1 (controle) foi comparada com a expressão de genes de OBA-09 em co-cultura com as mutantes: AaΔ29, AaΔ29P e AaΔ29P29.

A análise por meio do programa Bio-rad CFX Manager 3.0, permitiu identificar 5 genes (*cd74*, *crp*, *faslg*, *tlr1* e *vcam1*) regulados negativamente e 16 genes (*bcl2*, *birc3*, *c3*, *casp3*, *ep300*, *fas*, *fosb*, *grb2*, *il-1α*, *il-1β*, *il-6*, *il-8*, *nr3c1*, *prkcq*, *socs3* e *tnfrsf1b*) regulados positivamente para as células OBA-09 em co-cultura com uma ou mais mutantes de *A. actinomycetemcomitans* (Tabela 5).

Os genes *bcl2*, *birc3*, *c3*, *casp3*, *fas*, *prkcq*, *socs3* e *tnfrsf1b* foram regulados positivamente para OBA-09 quando em co-cultura com as mutantes de *A. actinomycetemcomitans* ($p < 0,05$), entretanto a célula epitelial quando infectada com a mutante defectiva em ambos os genes *omp29* e *omp29^{par}* (AaΔ29P29) mostrou níveis de transcritos ainda maiores que as demais, com aproximadamente: *bcl2* (70 X maior em relação às células submetidas à cepa selvagem), *birc3* (200 X), *c3* (70 X), *casp3* (230 X), *fas* (30 X), *prkcq* (60 X), *socs3* (40 X) e *tnfrsf1b* (50 X). A célula epitelial quando infectada com a mutante defectiva em *omp29* apresentou regulação positiva de: *bcl2* (6 X), *birc3* (16 X), *c3* (6 X), *casp3* (86 X), *fas* (4 X), *prkcq* (7 X), *socs3* (5 X) e *tnfrsf1b* (3 X). A célula OBA-09 quando infectada com a mutante defectiva em *omp29^{par}* apresentou expressão gênica positiva de: *bcl2* (2 X), *birc3* (21 X), *c3* (2 X), *casp3* (59 X), *fas* (3 X), *prkcq* (4 X), *socs3* (4 X) e *tnfrsf1b* (2 X). A transcrição do gene *fosb* foi regulada positivamente em células epiteliais quando infectadas com as mutantes AaΔ29, AaΔ29P e AaΔ29P29, respectivamente em 590, 388 e 1140 vezes.

Os genes *faslg*, *crp*, *trl-1* e *vcam1* foram regulados positivamente nas células epiteliais quando infectadas com AaΔ29 (1,5; 1,4; 1,2; e 2,2 vezes, respectivamente) e a AaΔ29P (1,3; 1,3; 1,2 e 1,9 vezes) respectivamente. Já *faslg*, *crp*, *trl-1* e *vcam1*, foram regulados negativamente na célula epitelial quando infectada com a AaΔ29P29 (0,3; 0,03; 0,3 e 0,7 vezes, respectivamente).

A expressão de *ep300*, *grb2* e *nrc3c1* foi regulada positivamente nas células epiteliais infectadas com: AaΔ29 (155, 16 e 12 vezes, respectivamente), AaΔ29P

(51; 7,9 e 8 vezes, respectivamente), e Aa Δ 29P29 (158, 21 e 22 vezes, respectivamente).

O gene *il-1 β* foi somente regulado positivamente na célula epitelial quando infectada com a mutante Aa Δ 29P29 (68 X), enquanto *il- α* , foi expresso positivamente na célula epitelial quando infectada com Aa Δ 29P e Aa Δ 29P29 (2,1 e 33 vezes, respectivamente). O gene *il-6* foi expresso positivamente em células OBA-09 quando infectadas com Aa Δ 29 e Aa Δ 29P29 (6 e 240 vezes, respectivamente), enquanto *il-8* foi somente regulado positivamente em células OBA-09 infectadas com Aa Δ 29P29 (55 X). A expressão de *cd74* foi regulada positivamente na célula epitelial quando infectadas com mutante Aa Δ 29 (1,4 vezes) e Aa Δ 29P (1,007 vezes), e expresso negativamente na célula epitelial infectada com Aa Δ 29P29 (0,4 vezes).

Tabela 5. Efeito da interação entre célula epitelial (OBA-09) e *A. actinomycetemcomitans* (AaD7S, AaΔ29, AaΔ29P, AaΔ29P29) na expressão relativa de genes associados à inflamação imediata após 4 horas de interação

Genes	Média de "foldchange" da expressão relativa em relação a co-cultura de <i>A. actinomycetemcomitans</i> com OBA-09		
	OBA+AaΔ29	OBA+AaΔ29P	OBA+AaΔ29P29
<i>bcl2</i>	5,9*	2,17*	68,91*
<i>birc3</i>	16,11*	21,86*	207,5*
<i>c3</i>	5,897*	2,173*	68,91*
<i>casp3</i>	86,82*	59,71*	231,8*
<i>ep300</i>	156,5*	51,63*	158,3*
<i>fas</i>	4,438*	3,16*	33,75*
<i>fosb</i>	595*	388*	1.141*
<i>grb2</i>	16,8*	7,945*	21,61*
<i>il-1α</i>	0,6926	2,085*	32,82*
<i>il-1β</i>	1,042	1,444	67,96*
<i>il-6</i>	5,938*	2,928	238,3*
<i>il-8</i>	1,122	1,778	55,33*
<i>nr3c1</i>	11,55*	8,225*	22,42*
<i>prkcq</i>	7,727*	4,691*	62,54*
<i>socs3</i>	4,993*	4,028*	49,07*
<i>tnfrs1b</i>	3,458*	1,959*	55,97*
<i>cd74</i>	1,366*	1,007*	0,4403*
<i>crp</i>	1,424*	1,338*	0,00321*
<i>faslg</i>	1,474*	1,275*	0,2973*
<i>trl1</i>	1,257*	1,223*	0,2624*
<i>vcam1</i>	2,204*	1,919*	0,7457*

Os dados mostram as médias dos "foldchanges" da expressão gênica em célula epitelial (OBA-09) após interação com *A. actinomycetemcomitans* (AaD7S, AaΔ29, AaΔ29P e AaΔ29P29) em relação a condição controle. "Foldchanges" = expressão gênica relativa das condições testadas (interação célula epitelial e AaΔ29, AaΔ29P, AaΔ29P29)/expressão gênica relativa com a condição controle (interação célula epitelial e *A. actinomycetemcomitans* selvagem D7S-1). * One-way ANOVA seguido de pós teste de *Dunnnett* (significante, $p < 0,05$).

3.7.3 Interação bacteriana em linhagem de célula epitelial gengival após 4 horas por qRT-PCR

Para maior confiabilidade dos resultados, após a realização do PCR Array foram selecionados os genes eucarióticos *il-1 β* , *il-8*, *tnf* e *ptgs2* (que codifica para COX2) para serem reavaliados por qRT-PCR após co-cultura de células OBA-09 e *A. actinomycetemcomitans* D7S-1 (isolado selvagem) e defectivas em *omp29* e/ou *omp29^{par}*. O gene *il-12 α* por não estar incluído dentre os genes do PCR Array também foi avaliado por qRT-PCR. Foi utilizado como controle a co-cultura de *A. actinomycetemcomitans* D7S-1 (isolado selvagem) com a célula OBA-09. Esses genes foram selecionados por estarem envolvidos diretamente na patogênese da periodontite.

Na Figura 34 nota-se que o aumento significativo da expressão gênica observada por PCR Array foi confirmada por qRT-PCR somente quando a célula OBA-09 foi infectada com a cepa Aa Δ 29P29 considerando os genes *il-1 β* , *il-8* e *tnf*. Por outro lado, o gene *ptgs2*, o qual não apresentou diferença significativa na expressão quando OBA-09 foi infectada com as cepas Aa Δ 29, a Aa Δ 29P e a Aa Δ 29P29 em relação à cepa selvagem por PCR Array, teve sua expressão significativamente aumentada por qRT-PCR, no ensaio onde as células foram infectadas com a cepa Aa Δ 29P29. Embora não tenha sido avaliada previamente por PCR Array o perfil da expressão de *il-12 α* em OBA-09 infectada com as mutantes de *A. actinomycetemcomitans* foi semelhante aos dos demais genes codificando citocinas avaliados por qRT-PCR.

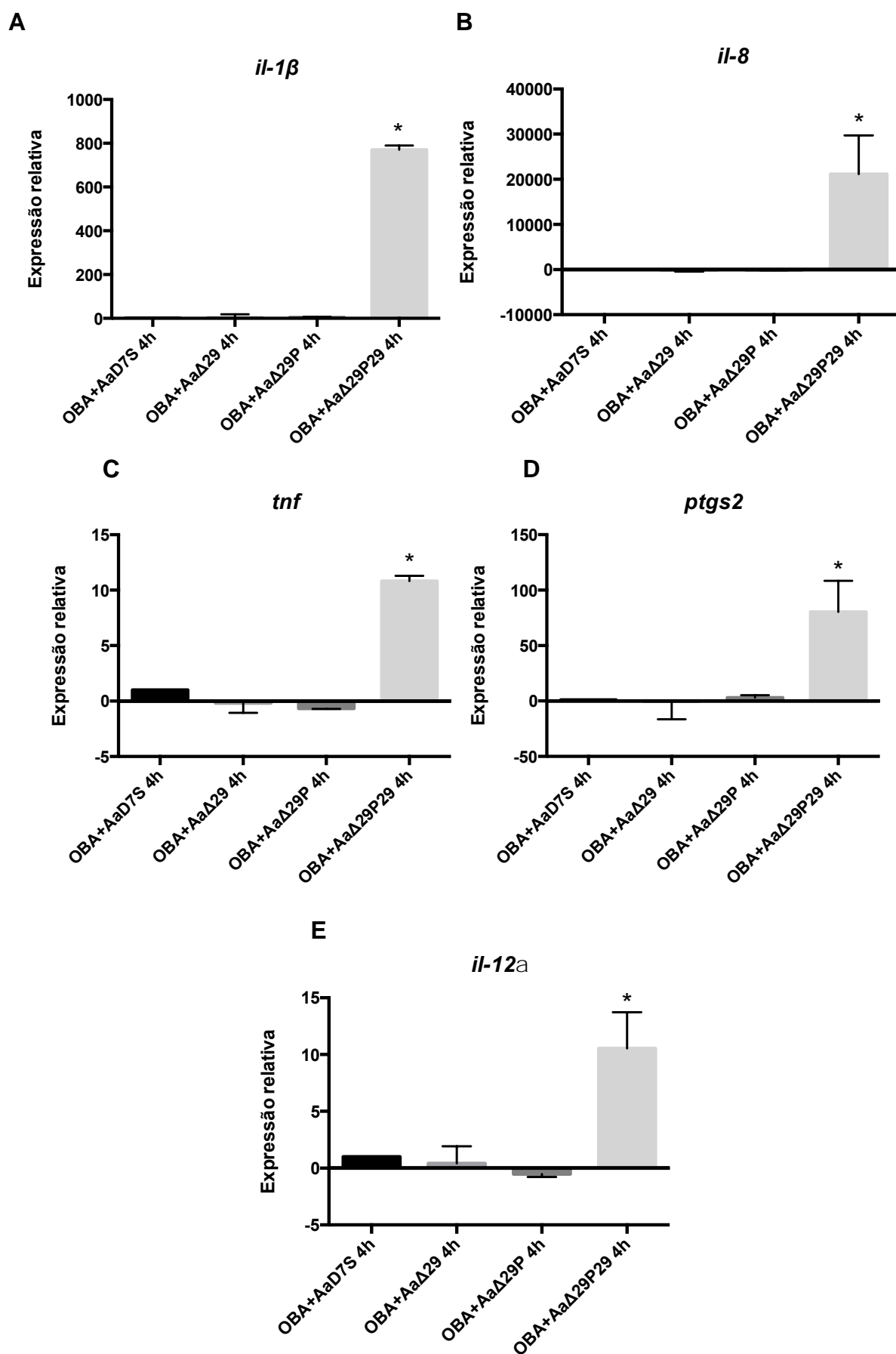


Figura 34- Análise da expressão relativa por qRT-PCR em ensaio de co-cultura por 4 horas entre célula epitelial gengival (OBA-09) e *A. actinomycetemcomitans* selvagem (AaD7S) e suas respectivas mutantes com deleção em *omp29* e/ou *omp29^{par}*: AaΔ29, AaΔ29P e

AaΔ29P29. **(A)** *il-1β*; **(B)** *il-8*; **(C)** *tnf*; **(D)** *ptgs2*; **(E)** *il-12α*. * One-way ANOVA seguido de pós-teste de *Dunnett* (significante, $p < 0,05$).

3.7.4 Interação bacteriana em linhagem de célula epitelial gengival após 24 horas por qRT-PCR

Foi analisada a expressão de genes eucarióticos relacionados às citocinas inflamatórias (IL-1β, IL-8, IL-10, IL-18 e TNF) e aos receptores celulares (IL-6R, NOD1, NOD2, NLRP3, TRL2 e TRL4), após co-cultura entre células OBA-09 e *A. actinomycetemcomitans* D7S-1 (isolado selvagem) e defectivas em *omp29* e/ou *omp29^{par}*. Foi utilizado como controle a co-cultura de *A. actinomycetemcomitans* D7S-1 (isolado selvagem) com a célula OBA-09.

A Figura 35 mostra aumento significativo da expressão de *il-1β* e *il-8* em células OBA quando infectada com a cepa AaΔ29P29 e diminuição significativa da expressão de *il-8* quando OBA-09 foi infectada com AaΔ29P e diminuição significativa da expressão de *trl-2* quando houve co-cultura com as cepas AaΔ29 e AaΔ29P. Já para os genes *il-18*, *il-6r* e *nod1* a expressão relativa para as células OBA-09 infectadas com as cepas mutantes foi semelhante à co-cultura de OBA com AaD7S. Não foi observada transcrição para os genes *il-10*, *tnf*, *nlrp3*, *trl4* e *nod2* em nenhuma das co-culturas.

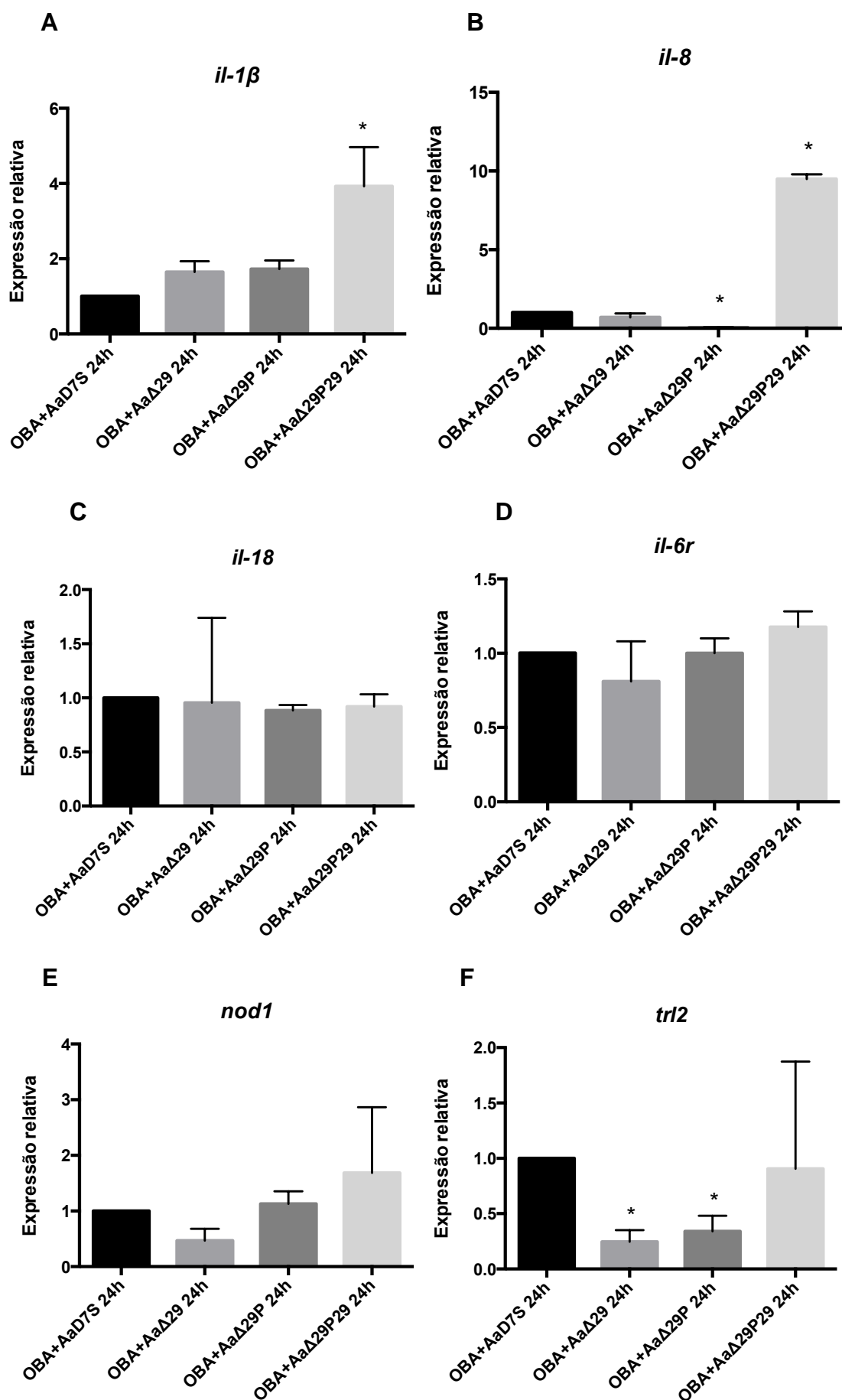


Figura 35- Análise da expressão relativa por qRT-PCR em ensaio de co-cultura por 24 horas entre célula epitelial gengival (OBA-09) e *A. actinomycetemcomitans* selvagem (AaD7S) e

suas respectivas mutantes com deleção em *omp29* e *omp29^{par}*: AaΔ29, AaΔ29P e AaΔ29P29. **(A)** *il-1β*; **(B)** *il-8*; **(C)** *il-18*; **(D)** *il-6r*; **(E)** *nod1*; **(F)** *trl-2*. * One-way ANOVA seguido de pós-teste de *Dunnett* (significante, $p < 0,05$).

3.7.5 Interação da proteína recombinante OMP29^{his} com célula epitelial gengival (OBA-09) por qRT-PCR

Visto que nas mutantes AaΔ29 e AaΔ29P29 ocorre uma compensação da perda da expressão de OMP29, pelo aumento da expressão de OMP39, foi analisada a expressão de genes relacionados às citocinas inflamatórias (IL-1β, IL-8, IL-10, IL-18 e TNF) e aos receptores celulares (IL-6R, NOD1, NOD2, NLRP3, TRL2 e TRL4), de células epiteliais na presença de OMP29^{his}. Foi utilizada como controle a cultura de células OBA (tempo 0), sem adição da proteína recombinante.

A Figura 36 mostra a diminuição significativa da expressão de *il-8* e *il-6r* em células OBA-09 em todos os tempos experimentais avaliados, enquanto *trl-2* foi regulado negativamente. O gene *il-18* apresentou aumento significativo da expressão em OBA-09 após 12 e 24 horas de interação com OMP29^{his}. Já para os genes *il-1β* e *nod1* a expressão relativa não variou nos tempos avaliados. Não foi observada transcrição para o genes *il-10*, *tnf*, *nod2*, *nlrp3* e *trl4* em nenhum tempo experimental.

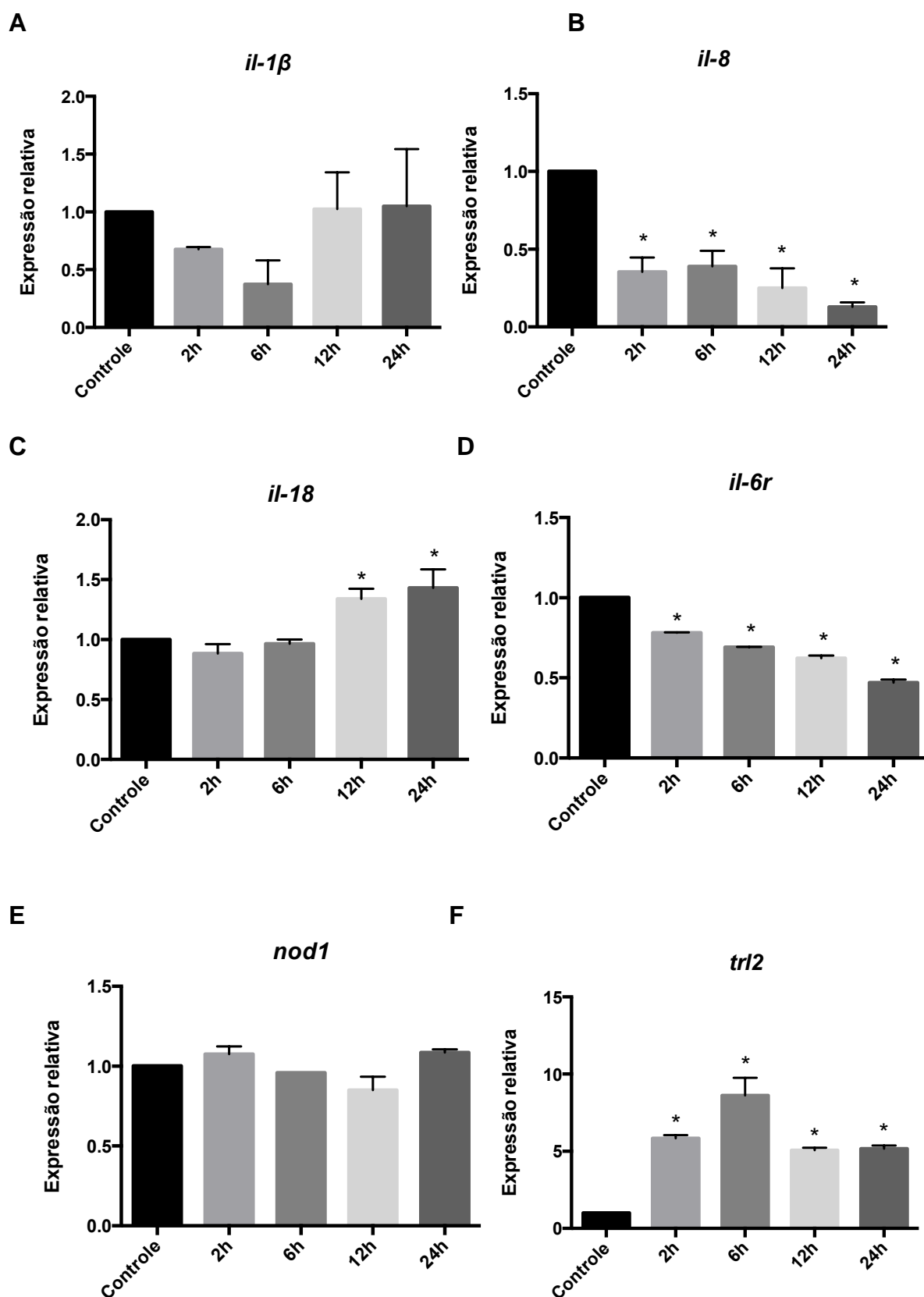


Figura 36- Análise da expressão relativa por qRT-PCR em ensaio de interação entre célula epitelial gengival (OBA-09) e OMP29^{his}. **(A)** *il-1 β* ; **(B)** *il-8*; **(C)** *il-18*; **(D)** *il-6r*; **(E)** *nod1*; **(F)** *trl-2*. * One-way ANOVA seguido de pós-teste de *Dunnnett* (significante, $p < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

Na periodontite, o delicado equilíbrio entre a microbiota subgingival e as defesas do hospedeiro é rompido e a destruição periodontal resulta da resposta do hospedeiro alterada contra a microbiota disbiótica. A microbiota oral exerce impacto significativo no sistema imune, assim como a resposta imune impacta a microbiota. Os denominados patógenos pedra-angular, exemplificados na periodontite particularmente por *P. gingivalis*, modulam a resposta do hospedeiro de maneira a induzir a perda da homeostase e permitir o aparecimento da microbiota disbiótica (HAJISHENGALLIS; LAMONT, 2012) por alterar o microambiente favorecendo a oferta de nutrientes, ao mesmo tempo que criam um ambiente permissivo para a proliferação de outros organismos, por afetar a resposta inflamatória que visa eliminar os agentes infecciosos (HAJISHENGALLIS; LAMONT, 2014).

Na periodontite agressiva, a disbiose da microbiota subgingival pode ser evidenciada pela baixa proporção de organismos benéficos (FAVERI et al., 2009; VAN ESSCHE et al., 2013), associada à presença de um consórcio formado por *A. actinomycetemcomitans*, *Streptococcus parasanguinis* e *Filifactor alocis*, fortemente associado à perda óssea. A partir desses dados hipotetizou-se que *A. actinomycetemcomitans* seria o patógeno angular na periodontite agressiva, modulando a resposta do hospedeiro pela produção de toxinas, o que resultaria em “paralisia imunológica” e permitiria a proliferação de certos organismos em sítios específicos (FINE et al., 2013).

Assim, a capacidade de evasão das defesas do hospedeiro é um dos principais atributos de um patógeno periodontal. As espécies bacterianas que constituem a microbiota podem ser classificadas na dependência do seu efeito funcional sobre o sistema imune em comensais inflamatórias ou patobiontes e em comensais imunoregulatórias, simbiontes ou autobiontes (PALM et al., 2015).

A. actinomycetemcomitans pode ser considerado um patobionte, devido à produção de LTX e CDT (ANDO-SUGUIMOTO et al., 2014; EBERSOLE et al., 1990). No presente estudo, pudemos demonstrar que a proteína imunodominante de *A. actinomycetemcomitans* OMP29, previamente associada à invasão em células não fagocíticas (KAJIYA et al., 2011), também pode ser considerada um fator associado à evasão das defesas do hospedeiro.

OMP29 de *A. actinomycetemcomitans* pode ser reconhecida por anticorpos séricos de indivíduos com periodontite agressiva, suspeitos de infecção por *A. actinomycetemcomitans* (WILSON, 1991a,b). Além disso, também o soro de camundongos imunizados com *A. actinomycetemcomitans* reagem contra OMP29, sugerindo sua relação com a virulência (KOMATSUZAWA et al., 2002). No presente estudo, corroborando com esses dados, foi possível obter altos títulos de anticorpos anti-OMP29 recombinante em camundongos imunizados com OMP29^{his}. Destaco também que OMP29^{his} foi reconhecida pelo soro de um paciente com periodontite agressiva, em ensaio de ELISA.

Primeiramente, quando buscávamos entender se haveria variação na sequência de *omp29* entre as cepas, descobrimos no banco de dados do pangenoma de *A. actinomycetemcomitans* (KITTIHOTIRAT et al., 2011) que todas as 14 cepas de *A. actinomycetemcomitans*, cujo genoma havia sido sequenciado, possuíam o gene *omp29* e identificamos, pela primeira vez, o gene parálogo de *omp29*, por nós denominado *omp29^{par}*. O alinhamento das sequências permitiu determinar que os genes *omp29* e *omp29^{par}* da cepa D7S-1 apresentam 76% de identidade entre si, quando comparadas as sequências de nucleotídeos e 75% de identidade, quando comparadas as sequências de aminoácidos.

O gene *omp29* é único no seu operon, e *omp29* e *omp29^{par}* são codificados em operons distintos na cepa D7S-1, visto que sequências compatíveis com um promotor putativo puderam ser observadas a montante de ambos os genes. Isso permitiu que a deleção de *omp29* na mutante *AaΔ29* não influenciasse negativamente a expressão de *omp29^{par}*, como demonstrado pelo estudo de proteômica empregado neste estudo.

Ambos os genes *omp29* e *omp29^{par}* foram encontrados no genoma de todas as amostras de *A. actinomycetemcomitans* avaliadas, classificadas em todos os sorotipos desta espécie. Destaca-se também que os genes *omp29* e *omp29^{par}* foram extremamente conservados entre as amostras avaliadas, com distância genética menor de 1%. Concordando com os dados da literatura da relação filogenética entre os sorotipos (CHEN et al., 2009; HAUBEK et al., 1995, 2007; KITTIHOTIRAT et al., 2010, 2011, 2016; PINHEIRO et al., 2011), observou-se que as sequências de *omp29* e *omp29^{par}* de *A. actinomycetemcomitans* foram relacionadas com sorotipos (Figuras 5 e 6). Para *omp29* e *omp29^{par}*, os isolados sorotipos **a** e **e** foram alocados no mesmo ramo enquanto os sorotipos **b** e **c** foram alocados no mesmo ramo

apenas em *omp29^{par}*, embora a distância entre **b** e **c** em *omp29* seja menor que 0,01. A análise da região promotora de *omp29* mostrou pouca variação entre as amostras (Figura 7), o que está de acordo com os nossos dados de transcrição de *omp29* entre amostras de diferentes sorotipos, em que houve pouca variação (Figura 10).

Por outro lado, o dendrograma com base nas sequências do promotor de *omp29^{par}* de *A. actinomycetemcomitans* mostrou grande variabilidade, particularmente porque duas amostras do sorotipo **b** apresentaram distância genética de mais de 5% nesta região em relação às demais (Figura 8). Destaca-se ainda que nas amostras H5P1_2217, SCC393_1292 e A160_1918, não foi possível detectar a sequência do promotor putativo de *omp29^{par}*. Assim, seria possível maior variação na expressão de *omp29^{par}* que de *omp29*, e seria interessante também avaliar a sua transcrição em diferentes amostras desta espécie.

Dados não publicados deste grupo de pesquisa mostraram que muitos indivíduos com periodontite agressiva apresentam anticorpos séricos contra LPS de *A. actinomycetemcomitans*, mas foram soronegativos para OMP29 (SARAIVA et al., dados não publicados), sugerindo a expressão diferencial de *omp29* entre as amostras. Umeda et al. (2013) observaram baixos níveis de transcrição de *omp29* na cepa ATCC 29523 (sorotipo a) em comparação com os isolados JP2 e SUNY 465 (sorotipo b) sobre diferentes condições ambientais, e sugeriram que o sorotipo **a** poderia não induzir resposta imune da mesma maneira que o sorotipo **b**, possivelmente explicando a associação do sorotipo a com a saúde.

No presente estudo, foi avaliada a expressão de *omp29* em uma única condição (cultura em caldo TSBYE com atmosfera de 10% de CO₂, a 37°C, em fase exponencial de crescimento) de amostras dos sorotipos: **a** (n=3), **b** minimamente leucotóxica (n=3), **b** altamente leucotóxica (n=3) e **c** (n=2). Um dos iniciadores (*forward*) usados na análise de transcrição de *omp29* apresentou 95% de similaridade com o gene *omp29^{par}*, no entanto, o segundo iniciador (*reverse*) não apresentou homologia com este gene indicando que o par de iniciadores utilizado é específico para análise da transcrição de *omp29*. Os dados de expressão relativa de *omp29* não demonstraram associação segundo os sorotipos (Figura 9). As cepas do sorotipo **a** 707 e C21-1 apresentaram maiores níveis de transcrição de *omp29*, entretanto, a cepa C27-1, também sorotipo **a** apresentou baixos níveis de transcritos (Figura 10). Estes dados indicam que a expressão de *omp29* pode diferir entre os

isolados de *A. actinomycetemcomitans*, mas o seu significado biológico não é claro, visto que as diferenças não foram expressivas.

Para entender melhor a função de *omp29* e *omp29^{par}*, três mutantes foram desenvolvidas por deleção de cada gene separadamente e também deleção simultânea dos genes (AaΔ29, AaΔ29P e AaΔ29P29). Embora OMP29 seja uma proteína estrutural, foi possível remover os genes separadamente, bem como a remoção de ambos os genes, simultaneamente. No entanto, quando *omp29* e *omp29^{par}* foram simultaneamente deletados (AaΔ29P29), observou-se expressão mais elevada de OMP39, processo também observado para o mutante defectiva em *omp29* (AaΔ29), sugerindo que o aumento da expressão de OMP39 ocorreu provavelmente para compensar a não expressão de OMP29, indicando a sua importância na manutenção da integridade da bactéria (Figura 28). Além disso, os dados sugerem que a deleção de *omp29^{par}* (AaΔ29P) não promoveu alterações no perfil de proteínas da membrana externa, mostrando que OMP29 é uma das principais proteínas da membrana externa, ao passo que *omp29^{par}* pode funcionar como um gene substituto, embora a análise proteômica tenha demonstrado a sua produção simultânea com OMP29 na linhagem selvagem (AaD7S).

A mutante AaΔ29P29 foi obtida utilizando a mutante defectiva em *omp29* (AaΔ29) como uma célula recipiente. No entanto, não foi possível transformar a mutante AaΔ29P29 com o vetor para complementação, embora a amostra selvagem fosse naturalmente competente. Portanto, pode-se sugerir que OMP29 estaria relacionada com a transferência de DNA. Estudos realizados em *E. coli* têm sugerido que OMPA serve como um receptor para transferência de DNA durante conjugação e de infecção por bacteriófagos (KLIMKE; FROST, 1998; KLIMKE et al., 2005; MORONA et al., 1984). Entretanto, estudos adicionais são necessários para confirmar a hipótese de que OMP29 de *A. actinomycetemcomitans* está relacionada com a transferência de DNA.

Com o emprego de OMP29 recombinante pudemos determinar a interação entre OMP29 e proteínas da matriz extracelular (fibrinogênio, fibronectina celular e plasmática, laminina, colágenos I, III, IV e V). Os dados demonstraram que OMP29 liga-se às fibronectinas celular e plasmática (Figura 22), indicando que OMP29 pode ser considerada uma adesina (HENDERSON et al., 2011). É conhecido que *A. actinomycetemcomitans* interage com os colágenos tipo I, III e V, mas as moléculas responsáveis por esta ligação não foram ainda esclarecidas (MINTZ; FIVES-

TAYLOR, 1999). A ligação de OMP29 com fibronectina é redundante nesta espécie, pois outros componentes de superfície de *A. actinomycetemcomitans* são capazes de ligarem-se à fibronectina, como a EmaA, a qual liga-se à fibronectina imobilizada (MINTZ et al., 2004) e ApiA (OMP100) (LI et al., 2004).

Nossos resultados indicaram que OMP29 não se liga aos domínios F30 (HBD) e F45 (GBD) da fibronectina, indicando a ligação a outros domínios de ligação. A adesina DrsA (Yad-like) de *Haemophilus ducreyi* liga-se também à fibronectina, mas os domínios de ligação desta à fibronectina também não foram esclarecidos (HENDERSON et al., 2011). Por outro lado, Hap de *Haemophilus influenzae* liga-se ao domínio GBD (SPAHICH et al., 2014), enquanto OpaA de *Neisseria gonorrhoeae* liga-se à HBD (VAN PUTTEN et al., 1998). Geralmente estas adesinas ligam-se também a outros substratos, como DrsA à vitronectina, enquanto Hap liga-se à laminina e colágeno tipo IV, ao contrário do observado para OMP29 de *A. actinomycetemcomitans*.

A. actinomycetemcomitans é um organismo capaz de invadir células não fagocíticas, uma estratégia claramente associada à virulência mediada pela OMP29 (KAJIYA et al., 2011). A entrada de *A. actinomycetemcomitans* em célula epitelial gengival medida por OMP29 ocorre concomitante a um aumento da expressão de actina F via quinase de adesão focal (FAK) (KAJIYA et al., 2011).

Os dados aqui apresentados, indicando que OMP29 liga-se à fibronectina celular, estão de acordo com seu papel na invasão. A ligação da fibronectina às integrinas da superfície da célula resulta na interação com os domínios de integrinas citoplasmáticas e consequente ativação da FAK, a qual é rapidamente fosforilada (YAMADA et al., 2003; ZAMIR; GEIGER, 2001). FAK é uma importante via de sinalização no rearranjo de actina, a qual é desencadeada pela estimulação das moléculas de adesão da superfície da célula. *S. aureus* ligado à fibronectina e, interagindo com integrinas na superfície celular, induz o agrupamento de integrinas e a sinalização por meio de FAK e quinases Src, com associação da ativação de tirosina-quinase e de reorganização do citoesqueleto de actina (AGERER et al., 2003, 2005; FOWLER et al., 2003). O processo de internalização de *P. gingivalis* inicia-se com a ligação do componente da fimbria FimA à receptores β 1-integrinas da superfície da célula epitelial gengival, resultando no recrutamento e ativação das integrinas do complexo de adesão focal (YILMAZ et al., 2002). Assim, os dados sugerem que a invasão de *A. actinomycetemcomitans* é mediada pela ligação de

OMP29 com fibronectina celular, que possivelmente interage com integrinas e induz a fosforilação de FAK.

A interação de células epiteliais com OMPA pode resultar em alteração da expressão gênica da célula eucarionte, como demonstrado para vários organismos (BHOWMICK et al., 2014; MARCH et al., 2011; OFORI-DARKO et al., 2000; SELVARAJ; PRASARADAO, 2005). Além de bactérias Gram-negativas nas quais OMPA é conservada, este fenômeno também ocorre por sinalização de outras proteínas ligantes de fibronectina de bactérias Gram-positivas. Por exemplo, a invasão de células endoteliais por *S. aureus* está associada com a produção de citocinas pró-inflamatórias (YAO et al., 1995), e as células endoteliais produzem menores níveis de citocinas quando induzidas por mutantes isogênicas que não apresentam as proteínas ligantes de fibronectina, FnBPA ou FnBPB (SODERQUIST et al., 2006).

Assim, optamos por avaliar se a interação com OMP29 teria a capacidade de alterar a expressão gênica de células epiteliais.

O epitélio interno do sulco gengival é uma importante barreira a ser rompida por organismos periodontais. A resposta de células epiteliais contra micro-organismos é uma resposta imune inata iniciada pelo seu reconhecimento por PRRs, tais como receptores *toll-like*, e sensores citoplasmáticos NODs. Os dados empregando interação entre as células epiteliais gengivais e as mutantes defectivas em *omp29* ou *omp29^{par}* sugerem que a expressão do receptor TLR2 poderia ser influenciada pela interação com estas proteínas de membrana externa (Figura 35 F). Esses resultados foram confirmados pelo aumento da expressão de *tlr2* nas células epiteliais que interagiram com OMP29 recombinante em todos os tempos experimentais avaliados (2, 6, 12 e 24 horas) (Figura 36 F). Esse resultado corrobora com a literatura, já que TLR2 também é receptor de OMPA de diferentes patógenos como: *Acinetobacter baumannii* (KIM et al., 2008), *Shigella flexneri* (BHOWMICK et al., 2014), *Klebsiella pneumonia* (JEANNIN et al., 2002) e *Escherichia coli* (KRISHNAN et al., 2013).

O ensaio de co-cultura durante 4 horas entre a célula epitelial gengival e a cepa mutante dupla demonstrou a regulação negativa de *tlr1*. Isso demonstra que OMP29 e OMP29^{par} parecem ter um papel importante na ativação de TLR1, já que quando os genes são deletados separadamente, mostraram uma expressão positiva deste receptor (Tabela 5). TLR1 reconhece PAMPs com especificidade para

bactérias Gram-negativas. Em conjunto com TRL2, o heterodímero TRL1/TRL2 reconhece peptídeo glicano e lipoproteínas (JIN et al., 2007).

Os receptores citoplasmáticos NOD1 e NOD2 possivelmente desempenham um papel na resposta aos organismos periodontais, já que são expressos no epitélio oral e bolsa periodontal (OKUGAWA et al., 2010, SUGAWARA et al., 2006). No nosso ensaio de interação de 24 horas entre as mutantes de *A. actinomycetemcomitans* e a célula OBA-09, a mutante defectiva em *omp29* induziu uma tendência de regulação negativa da expressão de NOD1 (Figura 35 E), sugerindo que OMP29 poderia estar envolvida na ativação deste sensor citoplasmático. Esse dado é relevante, uma vez que OMP29 foi associada à invasão do citoplasma da célula epitelial pela bactéria (KAJYIA et al., 2011). Entretanto, a mutante defectiva em ambos os genes não apresentou diferença na expressão deste gene, embora tenha que ser ponderado que outras alterações na composição da membrana na mutante dupla, como o aumento da expressão de OMP39, possam ter interferido no processo. Essa observação pode ganhar suporte pelos dados de interação de OMP29^{his} com célula OBA-09, onde houve uma tendência de regulação positiva da transcrição de *nod1* após 2 e 24 horas de interação, mas esta não foi estatisticamente significativa (Figura 36 E) e não foram detectados transcritos de *nod2* nas condições avaliadas. Portanto, os dados sugerem que OMP29 não participa da regulação da expressão de receptores NOD.

CD74 regula o tráfico intracelular e funciona como uma chaperona e um receptor de membrana das células eucariontes, modulando respostas de células B, T e dendríticas (BORGHESE; CLANCHY, 2011; CALANDRA; ROGER, 2003). Em nosso ensaio de interação por 4 horas, a transcrição de *cd74* foi regulada negativamente quando a célula OBA-09 foi infectada com a cepa AaΔ29P29, entretanto a transcrição deste gene foi regulada positivamente para as co-culturas com AaΔ29 e AaΔ29P (Tabela 5). Esses dados sugerem a importância de OMP29 e OMP29^{par} na ativação de CD74 e conseqüentemente no processo inflamatório, já que CD74 pode modular a lesão tecidual e a homeostase, além do seu efeito na regulação da resposta imune (VALIÑO-RIVAS et al., 2015). CD74 é um importante biomarcador, o qual pode ser medido no soro para avaliação da severidade de diferentes doenças, incluindo, infecções sistêmicas e sepse, câncer, doenças auto-imunes e distúrbios metabólicos (GRIEB et al., 2014). Assim, seria interessante avaliar a relação entre CD74 e doença periodontal, particularmente aquela

associada a *A.actinomycescomitans* e determinar se a atividade de inibição da transcrição de CD74 observada seria à OMP39

A interleucina 1 β é uma importante citocina pró-inflamatória, produzida por várias células, incluindo macrófagos e também atua em células endoteliais, induzindo aumento da expressão de moléculas que medeiam a adesão de leucócitos para o local da inflamação. Na periodontite, interleucina-1 β está associada com o recrutamento de neutrófilos e a ativação dos osteoclastos por meio da sua capacidade de induzir quimiocinas (PRESHAW; TAYLOR, 2011). Além disso, a produção de IL-1 β , presente no fluido crevicular de pacientes com doença periodontal e em animais com doença periodontal experimental promoveu a reabsorção óssea (BARKSKY et al., 2007; BUDUNELI; OZCAKA, 2012; DE MOLON et al., 2014; GARLET et al., 2006). A cepa selvagem de *A. actinomycescomitans* foi capaz de induzir a transcrição de *il-1 β* . Estudo anterior demonstrou que a interação entre *A. actinomycescomitans* e células epiteliais regula positivamente a transcrição de *il-1 α* (UMEDA et al., 2012). Em nosso estudo, *il-1 α* foi regulada positivamente quando da ausência de *omp29^{par}* e principalmente quando ambos *omp29* e *omp29^{par}* também foram removidos (Tabela 5), sugerindo que *omp29^{par}* poderia estar inibindo a resposta de IL-1 α . No entanto, deve ser notado que na mutante defectiva dupla, a expressão de OMP39 foi aumentada. Por outro lado, este fenômeno de compensação não foi aparente na mutante defectiva em *omp29^{par}*, o que reforça a possibilidade desta atividade pela proteína paróloga, e sugere diferentes funções para cada um dos genes *omp29* e *omp29^{par}*.

Os nossos dados indicam que as OMP29 e OMP29^{par} têm papel também na regulação da transcrição de *il-1 β* . A ativação de caspase-1, que induz a secreção de IL-1 β biologicamente ativa, requer estímulos auxiliares, por fatores como PAMPs e DAMPs, como exemplo LPS (MATSUSHIMA et al., 1986). Pudemos observar que as células epiteliais gengivais infectadas por 4 e 24 horas com *A. actinomycescomitans* defectiva em ambos *omp29* e *omp29^{par}*, mas não as células defectivas em apenas uma das proteínas OMP29, apresentaram regulação positiva da transcrição de *il-1 β* ($p < 0,05$), em relação a células infectadas com a cepa selvagem (Figuras 34 A e 35 A e Tabela 5). Assim, os dados de inibição da transcrição de *il-1 β* sugerem que esta função seria exercida por ambas OMP29/OMP29^{par} e/ou pelo aumento da expressão de OMP39 para a mutante dupla. Este questionamento foi respondido pela análise da transcrição deste gene

após a interação da célula epitelial com OMP29 recombinante (Figura 36 A), que resultou em uma tendência de regulação negativa, após 2 e 6 horas de incubação. Em contraste, OMPA de *Eschechiria coli* O157:H7 promove a expressão de IL-1 (IL-1 β e IL-1 α) em células dendríticas murínicas (TORRES et al., 2006).

O presente estudo mostrou que a interação de células epiteliais por 4 e 24 horas com a mutante defectiva em ambos os genes *omp29* e *omp29^{par}*, promoveu uma regulação positiva e estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da expressão de *il-8*, quando comparada com as células epiteliais infectadas com as outras mutantes e a cepa selvagem (controle) (Figuras 34 B e 35 B e Tabela 5). Se por um lado este resultado direciona uma vez mais para um possível papel de OMP39 na regulação da resposta imune, o papel de OMP29 não pode ser descartado. Quando OMP29^{his} entrou em contato com célula epitelial gengival (OBA-09), pudemos observar a regulação da expressão gênica promovida por apenas este fator de virulência, sem a interferência de outras modificações introduzidas pela ausência desta proteína estrutural de membrana externa. A análise das citocinas no sobrenadante do ensaio de interação das culturas de célula OBA-09 com a proteína OMP29 recombinante mostrou que esta regulou negativamente a transcrição de *il-8* ($p < 0,05$) (Figura 36 B). Assim, os dados sugerem que OMP29/OMP29^{par} parecem estar envolvidas na inibição da produção de IL-8, a qual é induzida por outras PAMPS de *A. actinomycetemcomitans*.

Entre os patógenos periodontais, *P. gingivalis* é capaz de inibir a produção de IL-8 nos tecidos periodontais pela secreção de uma serina fosfatase (SerB) (DARVEAU et al., 2010). Esta inibição transitória poderia retardar o recrutamento de neutrófilos, e, desse modo, facilitar a colonização inicial desse patógeno e de outros micro-organismos (HAJISHENGALLIS et al., 2011). OMP29 de *A. actinomycetemcomitans*, de maneira semelhante parece atuar sobre a produção de IL-8, e assim possivelmente retardar a atração de neutrófilos para que o micro-organismo possa ter tempo de colonizar o hospedeiro e invadir célula epitelial gengival (KAJIYA et al., 2011) e portanto evadir do sistema imune e induzir doença. Proteínas da família OMPA podem apresentar diferentes efeitos sobre a produção de IL-8: a proteína OMPA de *Acinetobacter* spp. estimula o promotor de *il-8* (OFORI-DARKO et al., 2000), enquanto a OMPA de *Klebsiella pneumoniae* reduz a expressão desta citocina em células do epitélio brônquico (MARCH et al., 2011)

Os nossos dados conflitam com estudos iniciais usando OMP29 purificada diretamente de *A. actinomycetemcomitans*, já que foi demonstrado que esta proteína induz a produção de IL-8 e inibe a comunicação intercelular (UCHIDA et al., 2005) e que esta poderia ser suprimida pela adição de maleato isorgladina (KISHIMITO et al., 2008). Por outro lado, estudos anteriores de nosso grupo indicam que o gene *il-8* não é regulado positivamente em células epiteliais gengivais infectadas por *A. actinomycetemcomitans* (UMEDA et al., 2012).

Os resultados conflitantes podem ser à metodologia de purificação da OMP29. No estudo de Uchida et al. (2005) e Kishimoto et al. (2008), OMP29 foi purificada diretamente do gel de poliacrilamida bidimensional, onde proteínas de membrana externa foram submetidas à eletroforese, e é possível que outros componentes bacterianos tenham contaminado a proteína, inclusive OMP29^{par}, que encontra-se em banda próxima a de OMP29. Ao contrário, no presente estudo, utilizamos além de mutantes defectivas para os genes *omp29* e *omp29^{par}*, OMP29 recombinante com cauda de histidina purificada em coluna, e a inibição da transcrição de *il-8* foi demonstrada.

Concluimos portanto, que OMP29 e OMP29^{par} poderiam estar envolvidas na regulação da resposta imune, regulando negativamente a transcrição de *il-1 β* e *il-8*. A regulação negativa de *il-1 β* , exigiria a presença de ambas OMP29/OMP29^{par}, mas outros fatores como a maior expressão de OMP39 podem também ter papel na regulação do processo inflamatório induzido por *A. actinomycetemcomitans*.

IL-6 é uma citocina multifuncional que pode induzir a diferenciação de osteoclastos, reabsorção óssea e a contínua destruição de tecidos (MIHARA et al., 2012; UDAGAWA et al., 1995). Essa citocina e seu receptor solúvel IL-6R participam do recrutamento de leucócitos durante a resposta inflamatória aguda por meio da regulação seletiva de quimioquinas inflamatórias e de eventos apoptóticos (HURST et al., 2001; JONES, 2005; MCLOUGHLIN et al., 2003). Pudemos observar que as células epiteliais gengivais infectadas por 4 horas com *A. actinomycetemcomitans*, defectiva em ambos os genes *omp29* e *omp29^{par}*, apresentaram regulação positiva da transcrição de *il-6* ($p < 0,05$), bem como aquelas infectadas com a mutante Aa Δ 29 em relação a células infectadas com a cepa selvagem (Tabela 5). Assim, os dados sugerem que a transcrição de *il-6* foi induzida na ausência de OMP29. No entanto, não pode ser descartado um possível papel de OMP39, mais expressa na mutante Aa Δ 29 e Aa Δ 29P29 .

LPS induz não somente a expressão de IL-6, mas também do seu receptor em fibroblasto gengival humano (TABETA et al., 2000). Em nosso estudo, a expressão do receptor de IL-6 (*il-6r*) foi determinada após 24 horas de interação, e não houve diferença na sua expressão entre as cepas, embora seja observada tendência de aumento da sua expressão na co-cultura com a cepas defectiva em *omp29* e *omp29^{par}* (Figura 35 D). Pudemos esclarecer esse resultado com a análise da transcrição deste gene após a interação da célula epitelial com OMP29 recombinante (Figura 36 D), que regulou negativamente a transcrição de *il-6r* após 2, 6, 12 e 24 horas de incubação. Assim, os dados mostram que OMP29 é capaz de reduzir a expressão de *il-6r*, sugerindo que OMP29 poderia resultar em menor resposta celular a IL-6, novamente modulando a inflamação.

O ensaio de co-cultura de OBA-09 com as mutantes de *A. actinomycetemcomitans* por 24 horas de incubação não demonstrou diferença no níveis de transcritos de *il-18*. Entretanto, quando a proteína OMP29^{his} interagiu com a cultura de OBA-09, observamos regulação positiva da transcrição de *il-18* (pertencente a família da IL-1) após 12 e 24 horas de incubação (Figura 36 C). A citocina pró-inflamatória IL-18 está envolvida com a progressão da periodontite (CHITRAPRIYA et al., 2015), sugerindo a participação de OMP29 na regulação do processo inflamatório induzido por *A. actinomycetemcomitans*. A produção de IL-18 é mediada pela ativação do receptor citoplasmático NLRP3 (Bostanci et al., 2009). Apesar da transcrição de NLRP3 não ter sido detectada em nosso estudo quando OMP29^{his} interagiu com a célula OBA-09, não significa que este receptor não é encontrado nas células OBA-09, já que os níveis de transcritos podem estar abaixo dos limites de detecção pelos métodos empregados. Assim, o aumento da transcrição de *il-18* promovido por OMP29 recombinante estão de acordo com seu papel no processo de invasão e ativação de receptores citoplasmáticos.

IL-18 possui fortes propriedades pró-inflamatórias, com base na sua capacidade de promover a secreção de outras citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-1 β , IL-8 e GM-CSF, aumentando a expansão, a migração e a ativação de neutrófilos durante as infecções (SAHOO et al., 2011). Destaca-se que a indução da transcrição de *il-18* por OMP29^{his} foi tardia (Figura 35 C), compatível com a necessária ativação inicial de NLRP3, ao contrário do processo de inibição da transcrição de *il-8* e *tlr2*, sugerindo que a dinâmica do processo inflamatório é

alterada pela OMP29, possivelmente possibilitando um controle inicial da resposta da célula que permita a invasão.

Estudos confirmaram que a regulação positiva de NLRP3 em células mononucleares é devido ao desafio bacteriano (ATAIDE et al., 2014; BELIBASAKIS; JOHANSSON, 2012; EITEL et al., 2012). A alta expressão do inflamassoma NLRP3 foi relatado nos tecidos gengivais de pacientes com periodontite (BOSTANCI et al., 2009; PARK et al., 2014), entretanto o mecanismo molecular de sinalização ainda não é conhecido. Indivíduos com diabetes mellitus e periodontite crônica, em estado hiperglicêmico pode exacerbar o estado inflamatório do tecido gengival pela ativação da via NLRP3 e essa resposta inflamatória anormal do hospedeiro pode contribuir para uma maior degradação dos tecidos (HUANG et al., 2015)

O gene *c3* (Tabela 5) foi regulado positivamente nas células OBA-09 interagindo com as mutantes de *A. actinomycetemcomitans* defectivas em *omp29* e/ou *omp29^{par}*. C3 modula tanto a resposta imune inata como a adaptativa e está associado a um sistema imuno-modulatório diverso e a processos biológicos que afetam a fisiopatologia humana (MASTELLOS et al., 2015). Portanto, os dados sugerem que OMP29/OMP29^{par} poderiam também modular a resposta mediada pelo sistema complemento.

SOCS3 desempenha um papel crítico na modulação de citocinas sinalizadoras envolvidas na osteoclastogênese, e foi demonstrada sua associação com diabetes severa associada à perda óssea alveolar induzida por inflamação (ZHANG et al., 2009). As co-culturas de células OBA-09 com as cepas AaΔ29, AaΔ29P e principalmente com AaΔ29P29, apresentaram um aumento do nível de transcritos de *socs3* (Tabela 5) quando comparadas as co-culturas com a cepa selvagem, sugerindo que OMP29/OMP29^{par} inibe a expressão de SOCS3 e controlaria a produção de citocinas inflamatórias.

A proteína C reativa (PRKCQ) codificada pelo gene *prkcq* também foi expressa positivamente na célula epitelial infectada pela cepa defectiva em *omp29* e/ou *omp29^{par}*. Um estado de inflamação sistêmica, incluindo o gerado por formas graves de periodontite, é caracterizado por altos níveis séricos de proteína C reativa (LALLA et al., 2007). Uma vez mais observamos que OMP29/OMP29^{par} regulam o processo inflamatório, compatível com o controle da inflamação que caracteriza clinicamente a periodontite agressiva associada à *A. actinomycetemcomitans*.

A citocina TNF- α exerce atividade biológica por meio de 2 receptores cognatos de superfície celular. O gene *tnfrsf1b* (Tabela 5), que codifica o receptor da superfamília 1B de TNF (TNFRSF1B; p75), foi expresso positivamente nas células OBA-09 interagindo com as mutantes de *A. actinomycetemcomitans*, particularmente com a mutante dupla (55,97 vezes). O fator de necrose tumoral é um dos principais mediadores da inflamação na pele e mucosas (KONDO; SAUDER, 1997). As citocinas associadas ao TNF- α ligam-se aos membros específicos da superfamília iniciando várias vias de sinalização que conduzem a parada do crescimento, proliferação ou morte celular (NAGATA, 1997). A importância de TNF- α no desenvolvimento de periodontite tem sido associada principalmente à sua capacidade de induzir a destruição do tecido conjuntivo e reabsorção óssea (STASHENKO et al., 1987). Assim, os dados sugerem que OMP29/OMP29^{par} exerce um papel de controle do quadro inflamatório, também por controlar a transcrição do receptor *tnfrsf1b*.

O tecido ósseo e o sistema imune são especialmente afetados pelo complexo fator de transcrição dimérico de proteína 1 (AP-1) e NF- κ B, os quais estão implicados no controle da proliferação, diferenciação e apoptose de ambos os osteoblastos e osteoclastos (BONIZZI; KARIN, 2004; JOCHUM et al., 2001). O fator de transcrição AP-1 é composto por membros da família de proteínas: Fos, incluindo Fosb, Jun e fator ativador de transcrição (ATF). AP-1 pode induzir inflamação mais severa por diferentes mecanismos, como por exemplo, a trans-repressão do receptor de glicocorticóide (WAGNER; EFERL, 2005). Estudos *in vitro* com fibroblastos gengivais humanos têm demonstrado que a IL-1 β pode induzir a atividade de NF- κ B e AP-1, os quais cooperam na indução de IL-6, IL-8, PGE2, e MMP-1 (KIDA et al., 2005). O gene que codifica NRC3C1, um receptor de glicocorticóide, também apresentou regulação positiva nas células infectadas pelas cepas defectivas em *omp29* e/ou *omp29*^{par} (Tabela 5), ratificando uma vez mais, que OMP29/OMP29^{par} está associada ao controle do processo inflamatório. Portanto, OMP29/OMP29^{par} pode ativar Fos/AP-1, já que a transcrição de *nr3c1* é reprimida na presença de OMP29/OMP29^{par}, e poderia atuar na doença periodontal por meio da indução da expressão das citocinas e degradação da matriz por MMPs.

Outros dados por nós obtidos também sugerem que OMP29/OMP29^{par} exercem um papel de controle do quadro inflamatório. Como demonstrado na tabela 5, a transcrição de *grb2*, que codifica as proteínas Grb, foi induzida nas células

epiteliais infectadas com as cepas defectivas em *omp29* e/ou *omp29^{par}*. Enquanto a proteína Grb-1 foi localizada no epitélio juncional e foi expressa positivamente no epitélio da bolsa de periodontite avançada (LI et al., 2005), Grb2 foi associada aos indivíduos portadores de periodontite crônica e agressiva recorrentes, quando comparados a indivíduos periodontalmente saudáveis (COVANI et al., 2008; MARCONCINI et al., 2010). Também foi observada uma forte correlação entre Grb2 e indivíduos portadores de periodontite e diabetes mellitus (COVANI et al., 2009). Assim, apesar destas associações, nossos resultados sugerem que OMP29/OMP29^{par} estão envolvidos na regulação da transcrição de *grb2*, enfatizando seu papel na evasão das defesas do hospedeiro decorrentes do processo inflamatório.

A proteína C reativa (CRP) é mais um biomarcador sensível para a infecção e inflamação, por ser uma das principais proteínas de fase aguda (KAPUR et al., 2015). No presente estudo, a transcrição de *crp* foi regulada positivamente nas células infectadas com as mutantes AaΔ29 e AaΔ29P, embora a variação nos níveis de transcrição relativa tenha sido muito pequena (na ordem de 30%). Por outro lado, os níveis de transcritos de *crp* foram profundamente reduzidos nas células submetidas à co-infecção com a mutante dupla AaΔ29P29 (Tabela 5). Apesar de ter sido demonstrado que indivíduos com periodontite agressiva possuem altos níveis de CRP quando comparado a indivíduos saudáveis e que após tratamento periodontal, bem sucedido, ocorre uma diminuição significativa dos níveis de CRP (GUPTA et al., 2015), os dados indicam que OMP29 e OMP29^{par} estão envolvidas no controle do processo inflamatório.

A ausência de OMP29 e OMP29^{par} promoveu a regulação positiva da transcrição de *vcam1* (Tabela 5) nas células infectadas pelas mutantes, quando estas foram comparadas com cepa selvagem em cerca de 2 vezes (200%), sugerindo que ambas OMP29 e OMP29^{par} inibem o processo inflamatório que visa eliminar o patógeno. VCAM1 está relacionado com a atração de leucócitos para o sítio da infecção, portanto *omp29* e *omp29^{par}* permitiriam uma permanência maior do patógeno no sítio colonizado. Ao contrário, a mutante dupla induziu a redução de transcritos de *vcam1* na ordem de 25%, que apesar de significativa, seu significado biológico é questionável e pode ser devido às profundas alterações na composição da membrana externa na mutante dupla, como superexpressão de OMP39.

A ausência de OMP29 e OMP29^{par} promoveu a regulação positiva da transcrição de *ptgs2* (Figura 34 D) e *il-12 α* nas células epiteliais infectadas (Figura 34 E), sugerindo que estas OMPs estariam envolvidas na inibição da transcrição destes genes. Como mencionado anteriormente, esta atividade poderia também ser atribuída a maior expressão de OMP39 na mutante dupla. IL-12 é uma citocina com atividade tanto pro-inflamatória como imuno-regulatória, e tem um papel importante na iniciação e no progressão da inflamação gengival (GEMMELL et al., 2004). A produção inicial de IL-12 durante a infecção pode ativar macrófagos e aumentar a imunidade celular, enquanto modula a resposta imune antígeno específica. O principal efeito da IL-12 é de estimular a produção de IFN- γ por células Th1 e regular a transição de uma resposta imune inata inicial para uma resposta imune adaptativa (TRINCHERI, 2003). Estudos têm demonstrado níveis de IL-12 significativamente maiores em indivíduos com periodontite crônica (TSAI et al., 2005; YUCEL et al., 2008), embora baixas concentrações de IL-12 tenham sido relatadas no fluido crevicular gengival quando há aumento da inflamação (OROZO et al., 2008). Estudos clínicos e experimentos em animais demonstraram que COX-2 (*ptgs2*) é um biomarcador clínico promissor para a periodontite, já que sua redução promoveu a estabilização da doença pelo controle da reabsorção óssea alveolar (GURGEL et al., 2004; HOLZHAUSEN et al., 2005; NASSAR et al., 2005; PINHO MDE et al., 2008; YEN et al., 2008). Apesar de OMP29/OMP29^{par} isoladamente não terem alterado a expressão de *il-12 α* , os dados sugerem que ambas ou OMP39 poderiam estar envolvidas neste processo.

Estudos prévios revelaram que a exposição *in vitro* de células epiteliais orais com LPS resultou em modificações de histonas, ativação de transcrição de co-ativadores, como p300/CBP e acúmulo de fator nuclear-kB (NF-kB) (MARTINS et al., 2015). Embora as implicações precisas de p300/CBP na progressão da doença periodontal sejam ainda desconhecidas, seu controle na sinalização de NF-kB está bem documentado e é de interesse para periodontia. A família NF-kB dos mamíferos é um gene alvo do co-ativador da transcrição e da histona acetiltransferase p300/CBP (ZHONG et al., 2002). A ativação da sinalização de NF-kB pode ser realizada por meio de estimulação de citocinas e produtos bacterianos, portanto, NF-kB parece ser um componente essencial da resposta imunológica inata (KIM et al., 2006). EP300 está associada também à apoptose (GHOSH et al., 2007), desta

forma, OMP29/OMP29^{par} demonstram estar envolvidas na resposta anti-apoptótica, já que e essas OMPs promovem a repressão da transcrição de *ep300* (Tabela 5).

A apoptose é a forma regulada de morte celular programada e alterações na sua regulação têm sido associadas com a doença periodontal (PRADEEP et al., 2014). Caspase-3 é um dos executores chave da apoptose (PRADEEP et al., 2014). Crescentes evidências mostram que a patogênese de doenças infecciosas é amplamente afetada por apoptose modulada por patógenos específicos, os quais induzem este processo por meio de produtos extracelulares específicos, como ácidos carboxílicos de cadeia curta produzidos por *P. gingivalis*, *Prevotella loescheii*, e *Fusobacterium nucleatum* (CHEN et al., 1994; MANGAN et al., 1991; ZYCHLINSKY et al., 1992), os quais induzem apoptose em células T (GEATCH et al., 1999; KURITA-OCHIAI et al., 1997), e em queratinócito gengival (SORKIN et al., 1998). Em *A. actinomycetemcomitans*, foi demonstrado que a toxina distensora citoletal induz apoptose em linfócitos B (SHENKER et al., 2015). Por outro lado, a patogênese da inflamação periodontal pode envolver a inibição da morte celular, por meio da regulação positiva da expressão de *bcl-2* (KUZENKO et al., 2015).

Pudemos observar que OMP29 está envolvida no processo inflamatório e que há uma resposta anti-apoptótica frente ao seu estímulo. Os genes *bcl2*, *birc3*, *casp3*, *ep300*, *fosb*, *grb2*, *nrc3c1*, *prkcq*, *socs3* e *tnfrsf1b* (Tabela 5) foram regulados positivamente nas células OBA-09 interagindo com as mutantes de *A. actinomycetemcomitans*.

OMP29 e OMP29^{par} parecem exercer papel no reconhecimento celular que ocorre no início de um processo inflamatório, já que a deleção de ambos genes promoveu regulação positiva da transcrição de *fas* (Tabela 5), sugerindo que OMP29 reduziria a expressão de FAS na célula OBA-09. Por outro lado, a ausência de OMP29 ou OMP29^{par} levou a um leve aumento da transcrição de *faslg*, ao contrário da co-cultura de células OBA-09 infectadas coma mutante dupla, que promoveu uma regulação negativa da transcrição de *fasl* (Tabela 5). O receptor FAS é necessário no processo de morte celular por apoptose desencadeada pela re-estimulação via TCR/CD3. Este processo é dependente da interação do receptor de morte FAS (CD95) com seu ligante cognato, FASL (CD95L) (JU et al., 1995; VAN PARIJS et al., 1996) que apresenta expressão limitada a alguns tipos celulares (ALDERSON et al., 1995; DHEIN et al., 1995). Portanto, os dados indicam que OMP29 e OMP29^{par}, estão envolvidos na resposta anti-apoptótica e podemos sugerir que a mutante

Aa Δ 29P29 possivelmente induz maior taxa de morte celular por apoptose, já que a expressão de *fas* está extremamente aumentada nas células infectadas por esta amostra (Tabela 5). Uma vez mais, relembramos a possibilidade de OMP39 cuja expressão é maior nas mutantes defectivas em OMP29, ter um papel como fator de virulência em *A. actinomycetemcomitans*, o qual merece maiores estudos.

A terceira maior via anti-apoptótica envolve a ativação transcricional do NF- κ B dependente dos fatores pro-sobrevivência, como cIAP-1 e cIAP-2 (BIRC3) (WANG et al., 1998). A atividade anti-apoptótica de OMP29/OMP29^{par} está de acordo também com a inibição da transcrição de *birc3* na co-cultura com a cepa selvagem, em relação àquela infectada com a mutante dupla defectiva em *omp29* e *omp29^{par}*. Apesar do controle da apoptose por *P. gingivalis*, cIAP-1 tampouco cIAP-2 são regulados por *P. gingivalis* (MAO et al., 2007). Diferentemente, *A. actinomycetemcomitans* parece ser capaz de controlar o processo apoptótico por esta via, visto que a célula OBA-09 infectada com a mutante dupla Aa Δ 29P29 promoveu uma regulação positiva de *birc3*.

O papel anti-apoptótico de OMP29 e OMP29^{par} está de acordo com a sua associação com a invasão em células não fagocíticas. O principal mecanismo de defesa da célula hospedeira contra bactérias intracelulares é a indução da apoptose. No entanto, patógenos intracelulares, inclusive obrigatórios como *Chlamydia* (MESSINGER et al., 2015), e como demonstrado no presente estudo para *A. actinomycetemcomitans*, desenvolveram mecanismos anti-apoptóticos de maneira a promover a sua sobrevivência no ambiente intracelular.

Diante do exposto, OMP29 parece ter um papel relevante na fisiopatologia da periodontite associada à *A. actinomycetemcomitans*. Primeiramente, o gene *omp29* apresenta-se conservado em todos isolados avaliados, e foi transcrito por todos os isolados avaliados sem haver uma diferença muito grande, que sugerisse se este fosse responsável pela variabilidade do potencial patogênico entre os sorotipos. O gene *omp29* parálogo foi por nós identificado em todas as cepas. Variações filogenéticas foram observadas principalmente na região promotora putativa de *omp29^{par}*, que poderia influenciar o potencial patogênico das cepas.

OMP29^{his} liga-se à matriz extracelular por meio da fibronectina plasmática e celular. Além de estar envolvida na etapa inicial da patogênese, a fibronectina interage com integrinas celulares de superfície que podem promover o recrutamento de proteínas sinalizadoras e do citoesqueleto, levando conseqüentemente a

reorganização do citoesqueleto de actina (envolvido no processo de invasão bacteriana) e alteração do perfil de expressão gênica. A interação de *A. actinomycetemcomitans* com célula epitelial gengival OBA-09 mostrou que *omp29* e *omp29^{par}* participam deste processo de sinalização. Como o perfil de proteínas de membrana externa foi alterado nas amostras mutantes em decorrência da deleção da OMP29, indicando sua importância como proteína estrutural da membrana externa, experimentos adicionais com a proteína recombinante ainda são necessários. Entretanto, os dados de interação das células epiteliais associados aos dados obtidos com a proteína OMP29^{his} confirmam que OMP29 ao interagir com células epiteliais interfere na expressão de *tlr2* e regula negativamente a transcrição de *il-6r*, *il-8* e *il-1 β* . Além disso, pudemos demonstrar que OMP29 interfere negativamente na regulação de vias apoptóticas, permitindo assim a maior sobrevivência no ambiente intracelular. A observação de que OMP29 está associada à evasão do sistema imune, sugere que este fator associado às toxinas leucotoxina e toxina distensora citoletal poderia alterar o microambiente subgengival e ao reduzir as defesas do hospedeiro, permite não somente a persistência da infecção por *A. actinomycetemcomitans* mas também de organismos patobiontes, levando ao desequilíbrio da microbiota e de sua relação com o hospedeiro e promovendo a destruição dos tecidos periodontais.

5 CONCLUSÃO

Dentro das condições experimentais do presente estudo e com base nos resultados, pôde-se concluir que:

- *omp29* e *omp29* parálogo (*omp29^{par}*) estão conservados em todas as cepas de *A. actinomycetemcomitans* avaliados. Variações filogenéticas foram observadas para *omp29* e *omp29^{par}*, bem como para os seus promotores e estas relacionam-se com os sorotipos.
- *omp29* foi transcrito por todos os isolados avaliados sem haver uma diferença muito grande que sugerisse que este fator seja responsável pela variabilidade do potencial patogênico entre os sorotipos.
- OMP29 é um imunógeno importante, já que induz altos títulos de anticorpos em camundongos Balb/c e é reconhecido em soro de paciente com periodontite agressiva.
- OMP29 interage com a fibronectina plasmática e celular, mas não com os colágenos tipo I, III, IV e V, fibrinogênio, laminina e plasminogênio.
- OMP29 e OMP29^{par} participam do processo de sinalização, observado quando *A. actinomycetemcomitans* interage com célula epitelial gengival (OBA-09), possivelmente alterando o perfil de receptores expressos pelas células epiteliais, pela regulação positiva da expressão de *tlr2*.
- OMP29 e OMP29^{par} alteram a expressão gênica de célula epitelial gengival (OBA), já que regulam negativamente a transcrição de *il-6r* e *il-8* e positivamente de *il-18*, sugerindo, portanto, que OMP29 pode participar na evasão do sistema imune.
- OMP29 e OMP29^{par} alteram a expressão gênica de célula epitelial gengival (OBA), possivelmente inibindo a apoptose, por regular negativamente genes

associados às vias apoptóticas, inibindo assim este importante mecanismo de defesa contra patógenos intracelulares.

Desta forma, OMP29 e possivelmente OMP29^{par} parecem ter um papel importante na patogênese de *A. actinomycetemcomitans*, possivelmente contribuindo para a evasão das defesas do hospedeiro e portanto favorecendo o estabelecimento da infecção.

REFERÊNCIAS*

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782-787, 2000.

AGERER, F.; MICHEL A.; OHLSEN K.; HAUCK C. R. Integrin mediated invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires Src family protein tyrosine kinases. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 42524-42531, 2003.

AGERER, F.; LUX, S.; MICHEL, A.; ROHDE, M.; OHLSEN, K.; HAUCK, C. R. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalisation. **J. Cell. Sci.**, v. 118, p. 2189-2200, 2005.

ALBANDAR, J. M.; DENARDIN, A. M.; ADESANYA, M. R.; DIEHL, S. R.; WINN, D. M. Associations between serum antibody levels to periodontal pathogens and early-onset periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 72, n. 11, p. 1463-1469, 2001.

ALDERSON, M. R.; TOUGH, T. W.; DAVIS-SMITH, T.; BRADDY, S.; FALK, B.; SCHOOLEY, K. A.; GOODWIN, R. G.; SMITH, C. A.; RAMSDELL, F.; LYNCH, D. H. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v. 181, n. 1, p. 71-77, 1995.

ALEXANDER, W. S.; HILTON, D. J. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 503-529, 2004.

ANDO, E. S.; DE-GENNARO, L. A.; FAVERI, M.; FERES, M.; DIRIENZO, J. M.; MAYER, M. P. Immune response to cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* in periodontitis patients. **J. Periodontal. Res.**, v. 45, p. 480-471, 2010.

ANDO-SUGUIMOTO, E. S.; DA SILVA, M. P.; KAWAMOTO, D.; CHEN, C.; DIRIENZO, J. M.; MAYER, M. P. The cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* inhibits macrophage phagocytosis and subverts cytokine production. **Cytokine**, v. 66, n. 1, p. 46-53, 2014.

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.; SUGA, I. M. Outer membrane protein 100, a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Mol. Microbiol.**, v. 50, p.1125-1139, 2003.

ASIKAINEN, S.; LAI, C. H.; ALALUUSUA, S.; SLOTS, J. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 6, n. 2, p. 115-118, 1991.

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ATAIDE, M. A.; ANDRADE, W. A.; ZAMBONI, D. S.; WANG, D.; SOUZA, MDO C.; FRANKLIN, B. S.; ELIAN, S.; MARTINS, F. S.; PEREIRA, D.; REED, G.; FITZGERALD, K. A.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T. Malaria- induced NLRP12/NLRP3-dependent caspase-1 activation mediates inflammation and hypersensitivity to bacterial superinfection. **PLoS Pathog.**, v. 10, p. e1003885, 2014.

BACHRACH, G.; MUSTER, Z.; RAZ, I.; CHAUSHU, G.; STABHOLZ, A.; NUSSBAUM, G.; GUTNER, M.; CHAUSHU, S. Assessing the levels of immunoglobulins in the saliva of diabetic individuals with periodontitis using checkerboard immunodetection. **Oral Dis.**, v. 14, p. 51-59, 2008.

BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature**, v. 392, p. 565-568, 1998.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines: CXC and CC chemokines. **Adv. Immunol.**, v. 55, p. 97-179, 1994.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Human chemokines: an update. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 675-705, 1997

BALASUBRAMANIAN, N.; ADVANI, S. H.; ZINGDE S. M. Protein kinase C isoforms in normal and chronic myeloid leukemic neutrophils: distinct signal for PKCa by immunodetection on PVDF membrane, decreased expression of PKCa and increased expression of PKCd in leukemic neutrophils. **Leuk. Res.**, v. 22, p. 597-604, 1998.

BALASUBRAMANIAN, N.; ADVANI, S. H.; ZINGDE, S. M. Protein kinase C isoforms in normal and leukemic neutrophils: altered levels in leukemic neutrophils and changes during myeloid maturation in chronic myeloid leukemia. **Leuk. Res.**, v. 26, p. 67-81, 2002.

BALTENSPERGER, K.; KOZMA, L. M.; CHERNIACK, A. D.; KLARLUND, J. K.; CHAWLA, A.; BANERJEE, U.; CZECH, M. P. Binding of the Ras activator son of sevenless to insulin receptor substrate-1 signaling complexes. **Science**, v. 260, n. 5116, p. 1950-1952, 1993.

BAUMANN, S.; HESS, J.; EICHHORST, S. T.; KRUEGER, A.; ANGEL, P.; KRAMMER, P. H.; KIRCHHOFF, S. An unexpected role for FosB in activation-induced cell death of T cells. **Oncogene**, v. 22, n. 9, p. 1333-1339, 2003.

BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A.; NEVES, F. O.; ATZINGEN, M. V.; WATANABE, M. M.; VIEIRA, M. L.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 11, p. 6356-6364, 2006.

BARKBY, H. E.; LEA, S. R.; PRESHAW, P. M.; TAYLOR, J. J. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. **Clin.**

Exp. Immunol., v. 149, n. 2, p. 217-225, 2007.

BECK, I. M.; VANDEN, B. W.; VERMEULEN, L.; BOUGARNE, N.; VANDER, C. B.; HAEGEMAN, G.; DE BOSSCHER, K. Altered subcellular distribution of MSK1 induced by glucocorticoids contributes to NF- κ B inhibition. **EMBO J.**, v. 27, p. 1682-1693, 2008.

BECK, E.; BREMER, E. Nucleotide sequence of the *ompA* gene coding the outer membrane protein II of *Escherichia coli* K-12. **Nucleic Acids Res.**, v. 8, p. 3011-3024, 1980.

BELIBASAKIS, G. N.; JOHANSSON, A. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* targets NLRP3 and NLRP6 inflammasome expression in human mononuclear leukocytes. **Cytokine**, v. 59, n. 1, p. 124-130, 2012.

BESWICK, E. J.; REYES, V. E. CD74 in antigen presentation, inflammation, and cancers of the gastrointestinal tract. **World J. Gastroenterol.**, v. 15, n. 23, p. 2855-2861, 2009.

BERTRAM, A.; ZHANG, H.; VON VIETINGHOFF, S.; DE PABLO, C.; HALLER, H.; SHUSHAKOVA, N.; LEY, K. Protein kinase C- θ is required for murine neutrophil recruitment and adhesion strengthening under flow. **J. Immunol.**, v. 188, n. 8, p. 4043-4051, 2012.

BHOWMICK, R.; PORE, D.; CHAKRABARTI, M. K. Outer membrane protein A (OmpA) of *Shigella flexneri* 2a induces TLR2-mediated activation of B cells: involvement of protein tyrosine kinase, ERK and NF- κ B. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e109107, 2014.

BREMER, E.; COLE, S. T.; HINDENACH, I.; HENNING, U.; BECK, E.; KURZ, C.; SCHALLER, H. Export of a protein into the outer membrane of *Escherichia coli* K-12. Stable incorporation of the OmpA protein requires less than 193 amino-terminal amino-acid residues. **Eur. J. Biochem.**, v. 122, p. 223-231, 1982.

BERTRAND, M. J.; MILUTINOVIC, S.; DICKSON, K. M.; HO, W. C.; BOUDREAU, A.; DURKIN, J.; GILLARD, J. W.; JAQUI, J. B.; MORRIS, S. J.; BARKER, P. A. cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. **Mol. Cell**, v. 30, p. 689-700, 2008.

BIET, F.; LOCHT, C.; KREMER, L. Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its role in defense against bacterial pathogens. **J. Mol. Med.**, v. 80, p. 147-162, 2002.

BOCHNER, B. S.; LUSCINSKAS, F. W.; GIMBRONE, M. A. JR.; NEWMAN, W.; STERBINSKY, S. A.; DERSE-ANTHONY, C. P.; KLUNK, D.; SCHLEIMER, R. P. Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. **J. Exp. Med.**, v. 173, p. 1553-1556, 1991.

BOSHIRA, H.; LI, J.; SUNYER, J. O. Recent advances on the complement system of teleost fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 239-262, 2006.

BOSTANCI, N.; EMINGIL, G.; SAYGAN, B.; TURKOGLU, O.; ATILLA, G.; CURTIS, M. A.; BELIBASAKIS, G. N. Expression and regulation of the NALP3 inflammasome complex in periodontal diseases. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 157, p. 415-422, 2009.

BONIZZI, G.; KARIN, M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. **Trends Immunol.**, v. 25, p. 280-288, 2004.

BORGHESE, F.; CLANCHY, F. I. CD74: an emerging opportunity as a therapeutic target in cancer and autoimmune disease. **Exp. Opin. Ther. Targets**, v. 15, p. 237-251, 2011.

BUDUNELI, N.; KINANE, D. F. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 38, p. 85-105, 2011. Suplemento 11.

BURZ, C.; BERINDAN-NEAGOE, I.; BALACESCU, O.; IRIMIE, A. Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. **Acta Oncol.**, v. 48, n. 6, p. 811-821, 2009.

BRADFORD, M. A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

CALANDRA, T.; ROGER, T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, p. 791-800, 2003.

CALIFANO, J. V.; SCHEIKEN, H. A.; TEW, J. G. Immunodominant antigen of *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* Y4 in high-responder patients. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 1582-1589, 1989.

CARRANZA, F. A. JR.; SAGLIE, R.; NEWMAN, M. G.; VALENTIN, P. L. Scanning and transmission electron microscopic study of tissue invading microorganisms in localized juvenile periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 54, p. 598-617, 1983.

CARLINFANTE, G.; LAZZARETTI, M.; FERRARI, S.; BIANCHI, B.; CRAFA, P. P53, bcl-2 and Ki-67 expression in adenoid cystic carcinoma of the palate. A clinicopathologic study of 21 cases with long-term follow-up. **Pathol. Res. Pract.**, v. 200, n. 11-12, p. 791-799, 2005.

CHAE, J. J.; KOMAROW, H. D.; CHENG, J.; WOOD, G.; RABEN, N.; LIU, P. P.; KASTNER, D. L. Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. **Mol. Cell**, v. 11, p. 591-604, 2003.

CHAE, J. J.; WOOD, G.; MASTERS, S. L.; RICHARD, K.; PARK, G.; SMITH, B. J.; KASTNER, D. L. The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1beta production. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, p. 9982-9987, 2006.

CHAMAILLARD, M.; HASHIMOTO, M.; HORIE, Y.; MASUMOTO, J.; QIU, S.; SAAB, L.; OGURA, Y.; KAWASAKI A.; FUKASE, K., KUSUMOTO, S., VALVANO, M. A.; FOSTER, S. J.; MAK, T. W.; NUÑEZ, G.; INOHARA, N. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 702-707, 2003.

CHEN, Y.; ZYCHLINSKY, A. Apoptosis induced by bacterial pathogens. **Microb. Pathog.**, v. 17, n. 203-212, p. 10, 1994.

CHENG, Y. A.; JEE, J.; HSU, G.; HUANG, Y.; CHEN, C.; LIN, C. P. A markerless protocol for genetic analysis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **J. Formos. Med. Assoc.**, v. 113, n. 2, p. 114-123, 2014.

CHITRAPRIYA, M. N.; RAO, S. R.; LAVU, V. Interleukin-17 and interleukin-18 levels in different stages of inflammatory periodontal disease. **J. Indian. Soc. Periodontol.**, v. 19, n. 1, p. 14-17, 2015.

CHINNAIYAN, A. M.; O'ROURKE, K.; TEWARI, M.; DIXIT, V. M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. **Cell**, v. 81, n. 4, p. 505-512, 1995.

CHO, I. J.; KIM, S. G. A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and glucocorticoid receptor (GR) interacting protein-1-dependent combinatorial mechanism of gene transrepression by GR. **Mol. Endocrinol.**, v. 23, p. 86-99, 2009.

CICARELLI, L. M.; PERRONI, A. G.; ZUGAIB, M.; DE ALBUQUERQUE, P. B.; CAMPA, A. Maternal and cord blood levels of serum amyloid A, C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interleukin-8 during and after delivery. **Mediators Inflamm.**, v. 2, p. 96-100, 2005.

COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochem. J.**, v. 326, p. 1-16, 1997.

COMMINS, S. P.; BORISH, L.; STEINKE, J. W. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 125, p. 53-72, 2010. Suplemento 2.

COVANI, U.; MARCONCINI, S.; GIACOMELLI, L.; SIVOZHELEVOV, V.; BARONE, A.; NICOLINI, C. Bioinformatic prediction of leader genes in human periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 79, n. 10, p. 1974-1983, 2008.

COVANI, U.; MARCONCINI, S.; DERCHI, G.; BARONE, A.; GIACOMELLI, L. Relationship between human periodontitis and type 2 diabetes at a genomic level: a data-mining study. **J. Periodontol.**, v. 80, n. 8, p. 1265-1273, 2009.

CONFER, A. W.; AYALEW, S. The OmpA family of proteins: Roles in bacterial pathogenesis and immunity. **Vet. Microbiol.**, v. 163, n. 3-4, p. 207-222, 2013.

COSTELLO, G. M.; VIPOND, R.; MACINTYRE, S. *Aeromonas salmonicida* possesses two genes encoding homologs of the major outer membrane protein, OmpA. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 1623-1630, 1996.

COTTER, T. G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. **Nat. Rev. Cancer**, v. 9, n. 7, p. 501-507, 2009.

CORISDEO, S.; GYDA, M.; ZAIDI, M.; MOONGA, B. S.; TROEN, B. R. New insights into the regulation of cathepsin K gene expression by osteoprotegerin ligand. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 285, n. 2, p. 335-339, 2001.

CORTELLI, S. C.; FERES, M.; SHIBLI, J. A.; FIGUEIREDO, L. C.; PADILHA DE OLIVEIRA, V.; CORTELLI, J. R. Presence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* on the Community Periodontal Index (CPI) teeth in periodontally healthy individuals. **J. Contemp. Dent. Pract.**, v. 15, n. 85, p. 93, 2005.

CUTLER, C. W.; TENG, Y. T. Oral mucosal dendritic cells and periodontitis: Many sides of the same coin with new twists. **Periodontol.** 2000, v. 45, p. 35-50, 2007.

CLAIRE, M.; HOLLAND, H.; LAMBRIS, J. D. The complement system in teleosts. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 12, p. 399-420, 2002.

CRAIG, R. G.; BOYLAN, R.; YIP, J.; MIJARES, D.; IMAM, M.; SOCRANSKY, S. S.; TAUBMAN, M. A.; HAFFAJEE, A. D. Serum IgG antibody response to periodontal pathogens in minority populations: relationship to periodontal disease status and progression. **J. Periodontal. Res.**, v. 37, n. 2, p. 132-146, 2002.

CRAVEN, R. R.; GAO, X.; ALLEN, I. C.; GRIS, D.; BUBECK WARDENBURG J.; MCELVANIA-TEKIPPE, E.; TING, J. P.; DUNCAN, J. A. *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin activates the NLRP3- inflammasome in human and mouse monocytic cells. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. e7446, 2009.

CYBULSKY, M.I.; FRIES, J.W.; WILLIAMS, A.J.; SULTAN, P.; EDDY, R.; BYERS, M.; SHOWS, T.; GIMBRONE, M. A. JR.; COLLINS, T. Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM1 gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, n. 17, p. 7859-7863, 1991.

DA SILVA-BOGHOSSIAN, C. M.; DO SOUTO, R. M.; LUIZ, R. R.; COLOMBO, A.P. Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. **Arch. Oral Biol.**, v. 56, n. 9, p. 899-906, 2011.

DABO, S. M.; CONFER, A. W.; QUIJANO-BLAS, R. A. Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotype A:3 OmpA: evidence of its role in *P. multocida* interaction with extracellular matrix molecules. **Microb. Pathog.**, v. 35, n. 4, p. 147-157, 2003.

DABO, S. M.; CONFER, A.; MONTELONGO, M.; YORK, P.; WYCKOFF, J. H. III. Vaccination with *Pasteurella multocida* recombinant OmpA induces strong but non-protective and deleterious Th2-type immune response in mice. **Vaccine**, v. 26, n. 34, p. 4345-4351, 2008.

DARVEAU, R. P. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 481-490, 2010.

DANG, P. M.; HAKIM, J.; PÉRIANIN, A. Immunochemical identification and translocation of protein kinase Cz in human neutrophils. **FEBS Lett.**, v. 349, n. 3, p. 338-342, 1994.

DARDING, M.; MEIER, P. IAPs: guardians of RIPK1. **Cell Death Differ.**, v.19, n. 1, p. 58-66, 2012.

DATTA, D. B.; ARDEN, B.; HENNING, U. Major proteins of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors. **J. Bacteriol.**, v. 131, p. 821-829, 1977.

DE BOSSCHER, K.; VANDEN BERGHE, W; HAEGEMAN, G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor- κ B or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. **Endocr. Rev.**, v. 24, p. 488-522, 2003.

DE MOLON, R. S.; DE AVILA, E. D.; BOAS NOGUEIRA, A. V.; CHAVES DE SOUZA, J. A.; AVILA-CAMPOS, M. J.; DE ANDRADE, C. R.; CIRELLI, J. A. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. **J. Periodontol.**, v. 85, n. 3, p. 465-477, 2014.

DE VILLIERS, W. J.; LOUW, J. P.; STRACHAN, A. F.; ETSEBETH, S. M.; SHEPHARD, E. G.; DE BEER, F. C. C-reactive protein and serum amyloid A protein in pregnancy and labour. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, v. 97, n. 8, p. 725-730, 1990.

DELIMA, A. J.; KARATZAS, S.; AMAR, S.; GRAVES, D. T. Inflammation and tissue loss caused by periodontal pathogens is reduced by interleukin-1 antagonists. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 511-516, 2002.

DEVERAUX, Q. L.; TAKAHASHI, R.; SALVESEN, G. S.; REED, J. C. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. **Nature**, v. 388, p. 300-304, 1997.

DIEFENBACHER, M.; SEKULA, S.; HEILBOCK, C.; MAIER, J. V.; LITFIN, M.; VAN DAM, H.; CASTELLAZZI, M.; HERRLICH, P.; KASSEL, O. Restriction to Fos family members of Trip6-dependent coactivation and glucocorticoid receptor-dependent trans-repression of activator protein-1. **Mol. Endocrinol.**, v. 22, p. 1767-1780, 2008.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, p. 2095-2147, 1996.

EBERSOLE, J. L.; TAUBMAN, M. A.; SMITH, D. J.; HAMMOND, B. F.; FREY, D. E. Human immune responses to oral microorganisms. II. Serum Antibody Responses to

antigens from *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* and the correlation with localized juvenile periodontitis. **J. Clin. Immunol.**, v. 3, p. 321-331, 1983.

EBERSOLE, J. L.; KRAIG, E.; BAUMAN, G.; SPITZNAGEL, J. K.; KOLODRUBETZ, D. Molecular approaches to leucotoxin as a virulence component in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Arch. Oral Biol.**, p. 69-78, 1990. Suplemento 35.

ECKELMAN, B. P.; SALVESEN, G. S. The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 3254-3260, 2006.

ECKELMAN, B. P.; SALVESEN, G. S.; SCOTT, F. L. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. **EMBO**, v. 7, p. 988-994, 2006.

EITEL, J.; MEIXENBERGER, K.; VAN LAAK, C.; ORLOVSKI, C.; HOCKE, A.; SCHMECK, B.; HIPPENSTIEL, S.; N'GUESSAN, P. D.; SUTTORP, N.; OPITZ, B. Rac1 regulates the NLRP3 inflammasome which mediates IL-1beta production in *Chlamydomphila pneumoniae* infected human mononuclear cells. **PLoS One**, v. 7, p. e30379, 2012.

ELICES, M. J.; OSBORN, L.; TAKADA, Y.; CROUSE, C.; LUHOWSKYJ, S.; HEMLER, M. E.; LOBB, R. R. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. **Cell**, v. 60, n. 4, p. 577-584, 1990.

ENGEBRETSON, S. P.; GRBIC, J. T.; SINGER, R.; LAMSTER, I. B. GCF IL-1beta profiles in periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 29, p. 48-53, 2002.

ERIKSEN, K. T.; HAUBEK, D.; POULSEN, K. Intragenomic recombination in the highly leukotoxic JP2 clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Microbiology**, v. 151, p. 3371-3379, 2005.

EVANS, K. E.; FOX, S. W. Interleukin-10 inhibits osteoclastogenesis by reducing NFATc1 expression and preventing its translocation to the nucleus. **BMC Cell. Biol.**, v. 8, p. 4, 2007.

FARIDA, R.; WILSON, M.; IVANYI, L. Serum IgG antibodies to lipopolysaccharides In various forms of periodontal disease in man. **Arch. Oral Biol.**, v. 31, p. 711-715, 1986.

FAVERI, M.; FIGUEIREDO, L. C.; DUARTE, P. M.; MESTNIK, M. J.; MAYER, M. P.; FERES, M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 36, n. 9, p. 739-749, 2009.

FAUSTMAN, D.; DAVIS, M. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v. 9, n. 6, p. 482-493, 2010.

FIGUEREDO, C. M.; RESCALA, B.; TELES, R. P.; TELES, F. P.; FISCHER, R. G.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S.; GUSTAFSSON, A. Increased interleukin-18 in gingival crevicular fluid from periodontitis patients. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 23, p. 173-176, 2008.

FILIP, C.; FLETCHER, G.; WULFF, J. L.; EARHART, C. F. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. **J. Bacteriol.**, v. 115, p. 717-722, 1973.

FINE, D. H.; VELLIAGOUNDER, K.; FURGANG, D.; KAPLAN, J. B. The *Actinobacillus actinomycetemcomitans* autotransporter adhesin Aae exhibits specificity for buccal epithelial cells from humans and old world primates. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 1947-1953, 2005.

FINE, D. H.; MARKOWITZ, K.; FAIRLIE, K.; TISCHIO-BERESKI, D.; FERRENDIZ, J.; FURGANG, D.; PASTER, B. J.; DEWHIRST, F. E. A consortium of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus parasanguinis*, and *Filifactor alocis* is present in sites prior to bone loss in a longitudinal study of localized aggressive periodontitis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 51, n. 9, p. 2850-2861, 2013.

FOWLER, T.; JOHANSSON, S.; WARY, K. K.; HOOK, M. Src kinase has a central role in in vitro internalisation of *Staphylococcus aureus*. **Cell Microbiol.**, v. 5, p. 417-426, 2003.

FUJISE, O.; WANG, Y.; CHEN, W.; CHEN, C. Adherence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* via serotype-specific polysaccharide antigens in lipopolysaccharides. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 23, p. 226-233, 2008.

FUJITA, T.; ASHIKAGA, A.; SHIBA, H.; UCHIDA, Y.; HIRONO, C.; IWATA, T.; TAKEDA, K.; KISHIMOTO, A.; HIRATA, R.; KAWAGUCHI, H.; SHIBA, Y.; KURIHARA, H. Regulation of IL-8 by Irsogladine maleate is involved in abolishment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced reduction of gap-junctional intercellular communication. **Cytokine**, v. 34, n. 5-6, p. 271-277, 2006.

FULLER, K.; MURPHY, C.; KIRSTEIN, B.; FOX, S. W.; CHAMBERS, T. J. TNF alpha potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL. **Endocrinology**, v. 143, n. 3, p. 1108-1118, 2002.

FREUD, R.; COLE S. T. Cloning and molecular characterization of the OmpA gene from *Salmonella typhimurium*. **Eur. J. Biochem.**, v. 134, n. 3, p. 497-502, 1983.

GRIEB, G.; KIM, B. S.; SIMONS, D.; BERNHAGEN, J.; PALLUA, N. MIF and CD74 - suitability as clinical biomarkers. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 14, n. 14, p. 1125-1131, 2014.

GAFAN, G. P.; LUCAS, V. S.; ROBERTS, G. J.; PETRIE, A.; WILSON, M.; SPRATT, A. Prevalence of periodontal pathogens in dental plaque of children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 9, p. 4141-4146, 2004.

GARLET, G. P.; CARDOSO, C. R.; CAMPANELLI, A. P.; FERREIRA, B. R.; AVILA-CAMPOS, M. J.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 147, n. 1, p. 128-138, 2007.

GARLET, G. P.; CARDOSO, C. R.; MARIANO, F. S.; CLAUDINO, M.; DE ASSIS, G. F.; CAMPANELLI, A. P.; ÁVILA-CAMPOS, M. J.; SILVA, J. S. Regulatory T cells attenuate experimental periodontitis progression in mice. **J. Clin. Periodontol.**, v. 37, p. 591-600, 2010.

GARLET, G. P.; CARDOSO, C. R.; SILVA, T. A.; FERREIRA, B. R.; AVILA-CAMPOS, M. J.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* through the modulation of mmps, rankl, and their physiological inhibitors. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 21, p. 12-20, 2006.

GEATCH, D. R.; HARRIS, J. I.; HEASMAN, P. A.; TAYLOR, J. J. In vitro studies of lymphocyte apoptosis induced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. **J. Periodont. Res.**, v. 34, n. 2, p. 70-78, 1999

GEMMELL, E.; CARTER, C. L.; HART, D. N.; DRYSDALE, K. E.; SEYMOUR, G. J. Antigen-presenting cells in human periodontal disease tissues. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 17, n. 6, p. 388-393, 2002.

GEMMELL, E.; SEYMOUR, G. J. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 35, p. 21-41, 2004.

GERSZTEN, R. E.; GARCIA-ZEPEDA, E. A.; LIM, Y. C.; YOSHIDA, M.; DING, H. A.; GIMBRONE, M. A. JR.; LUSTER, A. D.; LUSCINSKAS, F. W.; ROSENZWEIG, A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium underflow conditions. **Nature**, v. 398, n. 6729, p. 718-723, 1999

GHOSH, A. K.; VARGA, J. The transcriptional coactivator and acetyltransferase p300 in fibroblast biology and fibrosis. **J. Cell Physiol.**, v. 213, n. 3, p. 663-671, 2007.

GURGEL, B. C.; DUARTE, P. M.; NOCITI, F. H. JR.; SALLUM, E. A.; CASATI, M. Z.; SALLUM, A. W.; DE TOLEDO, S. Impact of an anti-inflammatory therapy and its withdrawal on the progression of experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 75, n. 12, p. 1613-1618, 2004.

GRAVES, D. T.; KANG, J.; ANDRIANKAJA, O.; WADA, K.; ROSSA, C. JR. Animal models to study host bacteria interactions involved in periodontitis. **Front. Oral Biol.**, v. 15, p. 117-132, 2012.

GRASWINCKEL, J. E.; VAN DER VELDEN, U.; VAN WINKELHOFF, A. J.; HOEK, F. J.; LOOS, B. G. Plasma antibody levels in periodontitis patients and controls. **J. Clin. Periodontol.**, v. 31, p. 562-568, 2004.

GRENIER, J. M.; WANG, L.; MANJI, G. A.; HUANG, W. J.; AL-GARAWI, A.; KELLY, R.; CARLSON, A.; MERRIAM, S.; LORA, J. M.; BRISKIN, M.; DISTEFANO, P. S.; BERTIN, J. Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF-kappaB and caspase-1. **FEBS Lett.**, v. 530, n. 1-3, p. 73-78, 2002.

GROSS, O.; POECK, H.; BSCHIEDER, M.; DOSTERT, C.; HANNESSCHLÄGER, N.; ENDRES, S.; HARTMANN, G.; TARDIVEL, A.; SCHWEIGHOFFER, E.; TYBULEWICZ, V.; MOCSAI, A.; TSCHOPP, J.; RULAND, J. Syk kinase signalling couples to the NLRP3 inflammasome for anti-fungal host defence. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 433-436. 2009.

GILLET, R.; JOHNSON N. W. Bacterial invasion of the periodontium in a case of juvenile periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 9, n. 1, p. 93-100. 1982.

GIRARDIN, S. E.; BONECA, I. G.; CARNEIRO, L. A.; ANTIGNAC, A.; JÉHANNON, M.; VIALA, J.; TEDIN, K.; TAHA, M. K.; LABIGNE, A.; ZÄHRINGER, U.; COYLE, A. J.; DISTEFANO, P. S.; BERTIN, J.; SANSONETTI, P. J.; PHILPOTT, D. J. Nod1 detects a unique muropeptide from Gram-negative bacterial peptidoglycan. **Science**, v. 300, n.5625, p. 1584-1587, 2003a.

GIRARDIN, S. E.; BONECA, I. G.; VIALA, J.; CHAMAILLARD, M.; LABIGNE, A.; THOMAS, G.; PHILPOTT, D. J.; SANSONETTI, P. J. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 11, p. 8869-8872, 2003b.

GUNSOLLEY, J. C.; BURMEISTER, J. A.; TEW, J. G.; BEST, A. M.; RANNEY, R. R. Relationship of serum antibody to attachment level patterns in young adults with juvenile periodontitis or generalized severe periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 58, p. 314-320, 1987.

GUNSOLLEY, J. C.; TEW, J. G.; CONNOR, T.; BURMESITER, J. A.; SCHENKEIN, H. A. Relationship between race and antibody reactive with periodontitis-associated bacteria. **J. Periodontal Res.**, v. 26, p. 59-63, 1991.

GUNSOLLEY, J. C.; TEW, J. G.; GOOSS, C. M.; BURMEISTER, J. A.; SCHENKEIN, H. A. Effects of race and periodontal status on antibody reactive with *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* Strain Y4. **J. Periodontal Res.**, v. 23, p. 303-307, 1988.

GUPTA, B.; SAWHNEY, A.; PATIL, N.; YADAV, M.; TRIPATHI, S.; SINHA, S.; SHARMA, S.; GUPTA, S. Effect of surgical periodontal therapy on serum C-reactive protein levels using ELISA in both chronic and aggressive periodontitis patient. **J. Clin. Diagn. Res.**, 2015. In press.

GORDON, M. K.; HAHN, R. A. Collagens. **Cell Tissue Res.**, v. 339, n. 1, 247-257, 2010.

GORE, Y.; STARLETS, D.; MAHARSHAK, N.; BECKER-HERMAN, S.; KANEYUKI, U.; LENG, L.; BUCALA, R.; SHACHAR, I. Macrophage migration inhibitory factor induces B cell survival by activation of a CD74-CD44 receptor complex. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 5, p. 2784-2792, 2008.

HABIB, A.; CREMINON, C.; FROBERT, Y.; GRASSI, J.; PRADELLES, P.; MACLOUF, J. Demonstration of an inducible cyclooxygenase in human endothelial cells using antibodies against the carboxyl-terminal region of cyclooxygenase-2. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 23448-23454, 1993.

HÄCKER, H.; KARIN M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. **Sci. STKE.**, v. 2006, n. 357, p. re13, 2006.

HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. **Periodontol.** **2000**, v. 5, p. 78-111, 1994.

HAJISHENGALLIS, G. Immune evasion strategies of *Porphyromonas gingivalis*. **J Oral Biosci.**, v. 53, n. 3, p. 233-240, 2011.

HAJISHENGALLIS, G.; LIANG, S.; PAYNE, M. A.; HASHIM, A.; JOTWANI, R.; ESKAN, M. A.; MCINTOSH, M. L.; ALSAM, A.; KIRKWOOD, K. L.; LAMBRIS, J. D.; DARVEAU, R. P.; CURTIS, M. A. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. **Cell Host Microbe**, v. 10, n. 5, p. 497-506, 2011.

HAJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R. J. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. **Mol. Oral Microbiol.**, v. 27, n. 6, p. 409-419, 2012.

HAJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R. J. Breaking bad: manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. **Eur. J. Immunol.**, v. 44, n. 2, p. 328-338, 2014.

HASNAN, J.; YUSOF, M. I.; DAMITRI, T. D.; FARIDAH, A. R.; ADENAN, A. S.; NORBAINI, T. H. Relationship between apoptotic markers (Bax and Bcl-2) and biochemical markers in type 2 diabetes mellitus. **Singapore Med. J.**, v. 51, n. 1, p. 50-55, 2010.

HARADA, A.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Interleukin 8 as a novel target for intervention therapy in acute inflammatory diseases. **Mol. Med. Today**, v. 2, n. 11, p. 482-489, 1996.

HARASZTHY, V. I.; HARIHARAN, G.; TINOCO, E. M.; CORTELLI, J. R.; LALLY, E. T.; DAVIS, E.; ZAMBON, J. J. Evidence for the role of highly leucotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 6, p. 912-922, 2000.

HAUBEK, D.; WESTERGAARD, J. Detection of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (JP2) in a Moroccan immigrant family with multiple cases of localized aggressive periodontitis. **Int. J. Paediatr. Dent.**, v. 14, n. 1, p. 41-48, 2004.

HAUBEK, D.; POULSEN, K.; ASIKAINEN, S.; KILIAN, M. Evidence for absence in northern Europe of especially virulent clonal types of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 2, p. 395-401, 1995.

HAUBEK, D.; POULSEN, K.; WESTERGAARD, J.; DAHLEN, G.; KILIAN, M. Highly toxic clone of *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* in geographically widespread cases of juvenile periodontitis in adolescents of african origin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 6, p. 1576-1578, 1996.

HAUBEK, D.; POULSEN, K.; KILIAN, M. Microevolution and patterns of dissemination of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 6, p. 3080-3088, 2007.

HEINRICH, P. C.; BEHRMANN, I.; HAAN, S.; HERMANN, H. M.; MÜLLER-NEWEN, G.; SCHAPER, F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **Biochem. J.**, v. 374, p. 1-20, 2003.

HEMPEL, S. L.; MONICK, M. M.; HUNNINGHAKE, G. W. Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 93, n. 1, p. 391-396, 1994.

HENDERSON, B.; NAIR, S.; PALLAS, J.; WILLIAMS, M. A. Fibronectin: a multidomain host adhesin targeted by bacterial fibronectin-binding proteins. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 35, n. 1, p. 147-200, 2011.

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

HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; DESVAUX, M.; FERNANDEZ, R. C.; ALA'ALDEEN, D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 68, n. 4, p. 692-744, 2004.

HOCKENBERRY, D.; NUÑEZ, G.; MILLIMAN, C.; SCHREIBER, R. D.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. **Nature**, v. 348, n. 6299, p. 334-336, 1990.

HOLMES, W. E.; LEE, J.; KUANG, W. J.; RICE, G. C.; WOOD, W. I. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. **Science**, v. 253, n. 5, p. 1278-1280, 1991.

HOLZHAUSEN, M.; SPOLIDORIO, D. M.; MUSCARA, M. N.; HEBLING, J.; SPOLIDORIO, L. C. Protective effects of etoricoxib, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2, in experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol. Res.**, v. 40, n. 3, p. 208-211, 2005.

HONG, H.; SZABO, G.; TAMM, L. K. Electrostatic couplings in OmpA ion-channel gating suggest a mechanism for pore opening. **Nat. Chem. Biol.**, v. 2, n. 11, p. 627-635, 2006.

HUANG, X.; YANG, X.; NI, J.; XIE, B.; LIU, Y.; XUAN, D.; ZHANG, J. Hyperglucose contributes to periodontitis: involvement of the NLRP3 pathway by engaging the innate immunity of oral gingival epithelium. **J. Periodontol.**, v. 86, n. 2, p. 327-335, 2015.

HUGHES, P.; DRAGUNOW, M. Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. **Pharmacol. Rev.**, v. 47, n. 1, p. 133-178, 1995.

HURST, S. M.; WILKINSON, T. S.; MCLOUGHLIN, R. M.; JONES, S.; HORIUCHI, S.; YAMAMOTO, N.; ROSE-JOHN, S.; FULLER, G. M.; TOPLEY, N.; JONES, S. A. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. **Immunity**, v. 14, n. 6, p. 705-714, 2001.

HUYNH, Q. N.; WANG, S.; TAFOLLA, E.; GANSKY, S. A.; KAPILA, S.; ARMITAGE, G. C.; KAPILA, Y. L. Specific fibronectin fragments as markers of periodontal disease status. **J. Periodontol.**, v. 73, n. 10, p. 1101-1110, 2002.

ISHIWATARI-HAYASAKA, H.; KAWASHIMA, H.; OSAWA, T.; NAGATA, S.; MIYASAKA, M. Induction of cell death by chimeric L-selectin-Fas receptors. **Int Immunol.**, v. 9, n. 4, p. 627-635, 1997.

KAJITA, K.; HONDA, T.; AMANUMA, R.; DOMON, H.; OKUI, T.; ITO, H.; YOSHIE, H.; TABETA, K.; NAKAJIMA, T.; YAMAZAKI, K. Quantitative messenger RNA expression of Toll-like receptors and interferon-alpha1 in gingivitis and periodontitis. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 22, n. 6, p. 398-402, 2007.

KAJIYA, M.; KOMATSUZAWA, H.; PAPANTONAKIS, A.; SEKI, M.; MAKIHIRA, S.; OUHARA, K.; KUSUMOTO, Y.; MURAKAMI, S.; TAUBMAN, M. A.; KAWAI, T. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Omp29 is associated with bacterial entry to gingival epithelial cells by F-actin rearrangement. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e18287, 2011.

KAPLAN, J. B.; PERRY, M. B.; MACLEAN, L. L.; FURGANG, D.; WILSON, M. E.; FINE, D. H. Structural and genetic analyses of Opolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. **Infect Immun.**, v. 69, n. 9, p. 5375-5384, 2001.

KAPUR, R.; HEITINK-POLLÉ, K. M.; PORCELIJN, L.; BENTLAGE, A. E.; BRUIN, M. C.; VISSER, R.; ROOS, D.; SCHASFOORT, R. B.; DE HAAS, M.; VAN DER SCHOOT, C. E.; VIDARSSON, G. C-reactive protein enhances IgG-mediated phagocyte responses and thrombocytopenia. **Blood**, v.125, n. 11, p. 1793-1802, 2015.

KATZ, J.; SAMBANDAM, V.; WU, J. H.; MICHALEK, S. M.; BALKO-VETZ, D. F. Characterization of *Porphyromonas gingivalis*-induced degradation of epithelial cell junctional complexes. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 3, p. 1441-1449, 2000.

KATO, S.; NAKASHIMA, K.; NAGASAWA, T.; ABIKO, Y.; FURUICHI, Y. Involvement of Toll-like receptor 2 in apoptosis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-infected THP-1 cells. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 46, n. 3, p. 164-170, 2013.

SHIWAMURA, S.; UEDA, H.; OKAMURA, H. Roles of interleukin-18 in tissue destruction and compensatory reactions. **J. Immunother.**, v. 25, p. 4-11, 2002. Suplemento 1.

KATZ, J.; SAMBANDAM, V.; WU, J. H.; MICHALEK, S. M.; BALKO-VETZ, D. F. Characterization of *Porphyromonas gingivalis*-induced degradation of epithelial cell junctional complexes. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 3, p. 1441-1449, 2000.

KATO, S.; NAKASHIMA, K.; NAGASAWA, T.; ABIKO, Y.; FURUICHI, Y. Involvement of Toll-like receptor 2 in apoptosis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-infected THP-1 cells. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 46, n. 3, p. 164-170, 2013.

KAWAI, T.; EISEN-LEV, R.; SEKI, M.; EASTCOTT, J. W.; WILSON, M. E.; TAUBMAN, M. A. Requirement of B7 costimulation for Th1-mediated inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. **J. Immunol.**, v. 164, n. 4, p. 2102-2109, 2000.

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.

KIDA, Y.; KOBAYASHI, M.; SUZUKI, T.; TAKESHITA, A.; OKAMATSU, Y.; HANAZAWA, S.; YASUI, T.; HASEGAWA, K. Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF-kappaB in human gingival fibroblasts. **Cytokine**, v. 29, n. 4, p. 159-168, 2005.

KIESELBACH, T.; ZIJNGE V.; GRANSTRÖM, E.; OSCARSSON, J. Proteomics of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* outer membrane vesicles. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0138591, 2015.

KILIAN, M.; FRANDSEN, E. V.; HAUBEK, D.; POULSEN, K. The etiology of periodontal disease revisited by population genetic analysis. **Periodontol.** 2000, v. 42, p. 158-179, 2006.

KIM, H. J.; HAWKE, N.; BALDWIN, A. S. NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. **Cell Death Different.**, v. 13, n. 5, p. 738-747, 2006.

KIM, Y. G.; PARK, J. H.; SHAW, M. H.; FRANCHI, L.; INOHARA, N.; NÚÑEZ, G. The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to Toll-like receptor ligands. **Immunity**, v. 28, n. 2, p. 246-257, 2008.

KIM, S. A.; YOO, S. M.; HYUN, S. H.; CHOI, C. H.; YANG, S. Y.; KIM, H. J.; JANG, B. C.; SUH, S. I.; LEE, J. C. Global gene expression patterns and induction of innate immune response in human laryngeal epithelial cells in response to *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 54, n. 1, p. 45-52, 2008.

KIM, T. S.; FRANK, P.; EICKHOLZ, P.; EICK, S.; KIM, C. K. Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with different ethnic backgrounds. **J. Periodontol.**, v. 80, n. 12, p. 2020-2027, 2009.

KINANE, D. F.; MOONEY, J.; EBERSOLE, J. L. Humoral immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. **Periodontol** 2000, v. 20, p. 289-340, 1999.

KRISHNAN, S.; CHEN, S.; TURCATEL, G.; ARDITI, M.; PRASADARAO, N. V. Regulation of Toll-like receptor 2 interaction with Ecgp96 controls *Escherichia coli* K1 invasion of brain endothelial cells. **Cell Microbiol.**, v. 15, n. 1, p. 63-81, 2013.

KISHIMOTO, T.; AKIRA, S.; NARAZAKI, M.; TAGA, T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. **Blood**, v. 86, n.4, p. 1243-1254, 1995.

KISHIMOTO, A.; FUJITA, T.; SHIBA, H.; KOMATSUZAWA, H.; TAKEDA, K.; KAJIYA, M.; HAYASHIDA, K.; KAWAGUCHI, H.; KURIHARA, H. Irsogladine maleate abolishes the increase in interleukin-8 levels caused by outer membrane protein 29 from *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* through the ERK pathway in human gingival epithelial cells. **J. Periodontal Res.**, v. 43, n. 5, p. 508-513, 2008.

KITTICHOTIRAT, W.; BUMGARNER, R.; CHEN, C. Markedly different genome arrangements between serotype a strains and serotypes b or c strains of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **BMC Genomics**, v. 11, p. 489, 2010.

KITTICHOTIRAT, W.; BUMGARNER, R. E.; ASIKAINEN, S.; CHEN, C. Identification of the pangenome and its components in 14 distinct *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains by comparative genomic analysis. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22420, 2011.

KITTICHOTIRAT, W.; BUMGARNER, R. E.; CHEN, C. Evolutionary Divergence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **J. Dent. Res.**, v. 95, n. 1, p. 94-101, 2016.

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, n. 3, p. 145-151, 2007.

KOBAYASHI, M.; FITZ, L.; RYAN, M.; HEWICK, R. M.; CLARK, S. C.; CHAN, S.; LOUDON, R.; SHERMAN, F.; PERUSSIA, B.; TRINCHIERI, G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v. 170, p. 827-845, 1989.

KOBAYASHI, H.; NAGASAWA, T.; ARAMAKI, M.; MAHANONDA, R.; ISHIKAWA, I. Individual diversities in interferon gamma production by human peripheral blood mononuclear cells stimulated with periodontopathic bacteria. **J. Periodontal. Res.**, v. 35, n. 6, p. 319-328, 2000a.

KOBAYASHI, K.; TAKAHASHI, N.; JIMI, E.; UDAGAWA, N.; TAKAMI, M.; KOTAKE, S.; NAKAGAWA, N.; KINOSAKI, M.; YAMAGUCHI, K.; SHIMA, N.; YASUDA, H.; MORINAGA, T.; HIGASHIO, K.; MARTIN, T. J.; SUDA, T. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. **J. Exp. Med.**, v. 191, n. 2, p. 275-286, 2000b.

KOMATSUZAWA, H.; ASAKAWA, 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. 288, n. 1-2, p. 195-201, 2002.

KOMATSUZAWA, H.; KAWAI, T.; WILSON, M. E.; TAUBMAN, M. A.; SUGAI, M.; SUGINAKA, H. Cloning of the gene encoding the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b OmpA-like outer membrane protein. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 2, p. 942-945, 1999.

KONDO, S.; SAUDER, D. N. Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 1 (p55) is a main mediator for TNF-alpha-induced skin inflammation. **Eur. J. Immunol.**, v. 27, n. 7, p. 1713-1718, 1997.

KORNMAN, K. S.; PAGE, R. C.; TONETTI, M. S. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. **Periodontology 2000**, v. 14, p. 33-53, 1997.

KORSMEYER, S. J.; WEI, M. C.; SAITO, M.; WEILER, S.; OH, K. J.; SCHLESINGER, P. H. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. **Cell Death Differ.**, v. 7, n. 12, p. 1166-1173, 2000.

KURITA-OCHIAI, T.; FUKUSHIMA, K.; OCHIAI, K. Butyric acid-induced apoptosis of murine thymocytes, splenic T cells, and human Jurkat T cells. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 1, p. 35-41, 1997.

KUZENKO, Y.; ROMANYUK, A.; POLITUN, A.; KARPENKO, L. S100, bcl2 and myeloperoxidase protein expressions during periodontal inflammation. **BMC Oral Health**, 2015. In press.

KLEINSCHMIDT, J. H. Folding kinetics of the outer membrane proteins OmpA and FomA into phospholipid bilayers. **Chem. Phys. Lipids**, v. 141, n. 1-2, p. 30-47, 2006.

KLESNEY-TAIT, J.; HILTKE, T. J.; MACIVER, I.; SPINOLA, S. M.; RADOLF, J. D.; HANSEN, E. J. The major outer membrane protein of *Haemophilus ducreyi* consists of two OmpA homologs. **J. Bacteriol.**, v. 179, n. 5, p. 1764-1773, 1997.

KLIMKE, W. A.; FROST, L. S. Genetic analysis of the role of the transfer gene, traN, of the F and R100-1 plasmids in mating pair stabilization during conjugation. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 16, p. 4036-4043, 1998.

KLIMKE, W. A.; RYPIEN, C. D.; KLINGER, B.; KENNEDY, R. A.; RODRIGUEZ-MAILLARD, J. M.; FROST, L. S. The mating pair stabilization protein, TraN, of the F plasmid is an outer membrane protein with two regions that are important for its function in conjugation. **Microbiology**, v. 151, p. 3527-3540, 2005.

KLOSE, M.; MACLINTYRE, S.; SCHWARZ, H.; HENNING, U. The influence of amino substitutions within mature part of an *Escherichia coli* outer membrane protein (OmpA) on assembly of the polypeptide into its membrane. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n. 26, p. 13297-13302, 1988.

KOEBNIK, R.; LOCHER, K. P.; VAN GELDER, P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. **Mol. Microbiol.**, v. 37, n. 2, p. 239-253, 2000.

JEANNIN, P.; RENNO, T.; GOETSCH, L.; MICONNET, I.; AUBRY, J. P.; DELNESTE, Y.; HERBAULT, N.; BAUSSANT, T.; MAGISTRELLI, G.; SOULAS, C.; ROMERO, P.; CEROTTINI, J. C.; BONNEFOY, J. Y. OmpA targets dendritic cells, induces their maturation and delivers antigen into the MHC class I presentation pathway. **Nat. Immunol.**, v. 1, n. 6, p. 502-509, 2000.

JEANNIN, P.; MAGISTRELLI, G.; GOETSCH, L.; HAEUW, J. F.; THIEBLEMONT, N.; BONNEFOY, J. Y.; DELNESTE, Y. Outer membrane protein A (OmpA): a new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen presenting cells-impact on vaccine strategies. **Vaccine**, p. 23-27, 2002. Suplemento 4.

JIN, M. S.; KIM, S. E.; HEO, J. Y.; LEE, M. E.; KIM, H. M.; PAIK, S. G.; LEE, H.; LEE, J. O. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a triacylated lipopeptide. **Cell**, v. 130, n. 6, p. 1071-1082, 2007.

JINADASA, R. N.; BLOOM, S. E.; WEISS, R. S.; DUHAMEL, G. E. Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. **Microbiology**, v. 157, p. 1851-1875, 2011.

JOCHUM, W.; PASSEGUE, E.; WAGNER, E. F. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. **Oncogene**, v. 20, p. 2401-2412, 2001.

JONES, S. A. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. **J. Immunol.**, v. 175, n. 6, p. 3463-3468, 2005.

JU, S. T.; PANKA, D. J.; CUI, H.; ETTINGER, R.; EL-KHATIB, M.; SHERR, D. H.; STANGER, B. Z.; MARSHAK-ROTHSTEIN, A. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. **Nature**, v. 373, n. 6513, p. 444-448, 1995.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. (1969). "Evolution of protein molecules". In Munro, H. N. **Mammalian protein metabolism**. New York: Academic Press, 1969, p. 121-123.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LALLA, E.; KAPLAN, S.; YANG, J.; ROTH, G. A.; PAPAPANOU, P. N.; GREENBERG, S. Effects of periodontal therapy on serum C-reactive protein, sE-selectin, and tumor necrosis factor-alpha secretion by peripheral blood-derived macrophages in diabetes. A pilot study. **J. Periodontal Res.**, v. 42, n. 3, p. 274-282, 2007.

LAM, J.; TAKESHITA, S.; BARKER, J. E.; KANAGAWA, O.; ROSS, F. P.; TEITELBAUM, S. L. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of

macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. **J. Clin. Invest.**, v. 106 n. 12, p. 1481-1488, 2000.

LENG, L.; BUCALA, R. Insight into the biology of macrophage migration inhibitory factor (MIF) revealed by the cloning of its cell surface receptor. **Cell Res.**, v. 16, n. 2, p. 162-168, 2006.

LENG, L.; METZ, C. N.; FANG, Y.; XU, J.; DONNELLY, S.; BAUGH, J.; DELOHERY, T.; CHEN, Y.; MITCHELL, R.A.; BUCALA, R. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. **J. Exp. Med.**, v. 197, n. 11, p. 1467-1476, 2003.

LI, H.; LIN, X. Positive and negative signaling components involved in TNF α -induced NF- κ B activation. **Cytokine**, v. 41, n. 1, p. 1-8, 2008.

LI, P.; NIJHAWAN, D.; BUDIHardJO, I.; SRINIVASULA, S. M.; AHMAD, M.; ALNEMRI, E. S.; WANG, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 479-489, 1997.

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, n. 1, p. 16-25, 2004.

LI, M.; FIRTH, J. D.; PUTNINS, E. E. Keratinocyte growth factor-1 expression in healthy and diseased human periodont tissues. **J. Periodont. Res.**, v. 40, n. 2, p. 118-128, 2005.

LIAO, H.; BUCALA, R.; MITCHELL, R. A. Adhesion-dependent signaling by macrophage migration inhibitory factor (MIF). **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 1, p. 76-81, 2003.

LISTGARTEN, M. A.; HELLDEN, L. Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. **J. Clin. Periodont.**, v. 5, n. 2, p. 115-132, 1978.

LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S. B. Experimental gingivitis in man. **J. Periodontol.**, v. 36, p. 177-187, 1965.

LOESCHE, W. J.; SYED, S. A.; SCHMIDT, E.; MORRISON, E. C. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. **J Periodontol.**, v. 56, n. 8, p. 447-56, 1985.

LONGO, P.L. **Construção, análise de fenótipo e da transcrição gênica de uma amostra mutante de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* deficiente em *arcB***. 2008. 112 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LUO, X.; BUDIHardJO, I.; ZOU, H.; SLAUGHTER, C.; WANG, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. **Cell**, v. 94, n. 4, p. 481-490, 1998.

LYONS-GIORDANO, B.; PRATTA, M. A.; GALBRAITH, W.; DAVIS, G. L.; ARNER, E. C. Interleukin-1 differentially modulates chondrocyte expression of cyclooxygenase-2 and phospholipase A2. **Exp. Cell Res.**, v. 206, n. 1, p. 58-62, 1993.

MA, X.; ASTE-AMEZAGA, M.; TRINCHIERI, G. Regulation of interleukin-12 production. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 795, p. 13-25, 1996.

MAEDA, T.; MAEDA, H. ; YAMABE, K.; MINESHIBA, J.; TANIMOTO, I.; YAMAMOTO, T.; NARUISHI, K.; KOKEGUCHI, S.; TAKASHIBA, S. Highly expressed genes in a rough-colony-forming phenotype of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: implication of a mip-like gene for the invasion of host tissue. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 58, n. 2, p. 226-236, 2009.

MAES, M.; SONG, C.; LIN, A. H.; BONACCORSO, S.; KENIS, G.; DE JONGH, R.; BOSMANS, E.; SCHARPE, S. Negative immunoregulatory effects of antidepressants: inhibition of interferon-gamma and stimulation of interleukin-10 secretion. **Neuropsychopharmacology**, v. 20, p. 370-379, 1999.

MAHANONDA, R.; PICHYANGKUL, S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. **Periodontol.** 2000, v. 43, p. 41-55, 2007.

MAHONEY, D. J.; CHEUNG, H. H.; MRAD, R. L.; PLENCHETTE, S.; SIMARD, C.; ENWERE, E.; ARORA, V.; MAK, T. W.; LACASSE, E. C.; WARING, J.; KORNELUK, R. G. Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNF-alpha-mediated NF-KB activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, n. 33, p. 11778-11783, 2008.

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

MANICASSAMY, S.; GUPTA, S.; SUN, Z. Selective function of PKC-theta in T cells. **Cell. Mol. Immunol.**, v. 3, p. 263-270, 2006.

MAO, S.; PARK, Y.; HASEGAWA, Y.; TRIBBLE, G. D.; JAMES, C. E.; HANDFIELD, M.; STAVROPOULOS, M. F.; YILMAZ, O.; LAMONT, R. J. Intrinsic apoptotic pathways of gingival epithelial cells modulated by *Porphyromonas gingivalis*. **Cell Microbiol.**, v. 9, n. 8, p. 1997-2007, 2007.

MARIATHASAN, S.; WEISS, D. S.; NEWTON, K.; MCBRIDE, J.; O'ROURKE, K.; ROOSE-GIRMA, M.; LEE, W. P.; WEINRAUCH, Y.; MONACK, D. M.; DIXIT, V. M. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 228-232, 2006.

MARCH, C.; MORANTA, D.; REGUEIRO, V.; LLOBET, E.; TOMÁS, A.; GARMENDIA, J.; BENGOCHEA, J. A. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane protein A is required to prevent the activation of airway epithelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n. 12, p. 9956-9967, 2011.

MARCONCINI, S.; COVANI, U.; BARONE, A.; VITTORIO, O.; CURCIO, M.;

BARBUTI, S.; SCATENA, F.; FELLI, L.; NICOLINI, C. Real-time quantitative polymerase chain reaction analysis of patients with refractory chronic periodontitis. **J Periodontol.**, v. 82, n. 7, p. 1018-1024, 2011.

MARTINS, M. D.; JIAO, Y.; LARSSON, L.; ALMEIDA, L. O.; GARAICOA-PAZMINO, C.; LE, J. M.; SQUARIZE, C. H.; INOHARA, N.; GIANNOBILE, W. V.; CASTILHO, R. M. Epigenetic modifications of histones in periodontal disease. **J. Dent. Res.**, 2015. In press.

MASTELLOS, D. C.; RICKLIN, D.; HAJISHENGALLIS, E.; HAJISHENGALLIS, G.; LAMBRIS, J. D. Complement therapeutics in inflammatory diseases: promising drug candidates for C3-targeted intervention. **Mol. Oral Microbiol.**, 2015. In press.

MATSUSHIMA, K.; TAGUCHI, M.; KOVACS, E. J.; YOUNG, H. A.; OPPENHEIM, J. J. Intracellular localization of human monocyte associated interleukin 1 (IL 1) activity and release of biologically active IL 1 from monocytes by trypsin and plasmin. **J. Immunol.**, v. 136, n. 18, p. 2883-2891, 1986.

MCLOUGHLIN, R. M.; WITOWSKI, J.; ROBSON, R. L.; WILKINSON, T. S.; HURST, S. M.; WILLIAMS, A. S.; WILLIAMS, J. D.; ROSE-JOHN, S.; JONES, S. A.; TOPLEY, N. Interplay between IFN-gamma and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation. **J. Clin. Invest.**, v. 112, n. 4, p. 598-607, 2003.

MESSINGER, J. E.; NELTON, E.; FEENEY, C.; GONDEK, D. C. Chlamydia Infection Across Host species boundaries promotes distinct sets of transcribed anti-apoptotic factors. **Front. Cell Infect. Microbiol.**, v. 5, p. 96, 2105.

MIGGIN, S. M.; O'NEILL, L. A. New insights into the regulation of TLR signaling. **J Leukoc Biol.**, v. 80, n. 2, p. 220-226, 2006.

MIHARA, M.; HASHIZUME, M. YOSHIDA, H.; SUZUKI, M.; SHIINA, M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. **Clinical Science**, v. 122, n. 4, p. 143-159, 2012.

MILLER, E. J.; LI, J.; LENG, L.; MCDONALD, C.; ATSUMI, T.; BUCALA, R.; YOUNG, L. H. Macrophage migration inhibitory factor stimulates AMP-activated protein kinase in the ischaemic heart. **Nature**, v. 451, n. 7178, p. 578-582, 2008.

MINTZ, K. P.; FIVES-TAYLOR, P. M. Binding of the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to extracellular matrix proteins. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 14, n. 2, p. 109-116, 1999.

MINTZ, K. P.; FIVES-TAYLOR, P. M. Adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to a human oral cell line. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 9, p. 3672-3678, 1994.

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

MITEVA, L.; STANILOVA, S. The combined effect of interleukin (IL)-10 and IL-12 polymorphisms on induced cytokine production. **Hum. Immunol.**, 69, n. 9, p. 562-566, 2008.

MITCHELL, R. A.; METZ, C. N.; PENG, T.; BUCALA, R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 25, p. 18100-18106, 1999.

MORI, Y.; YOSHIMURA, A.; UKAI, T.; LIEN, E.; ESPEVIK, T.; HARA, Y. Immunohistochemical localization of Tolllike receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 18, n. 1, p. 54-58, 2003.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunol. Rev.**, v. 226 p. 205-218, 2008.

MOGENSEN, J. E.; OTZE, D. E. Interaction between folding factors and bacterial outer membrane proteins. **Mol. Microbiol.**, v. 57, n. 2, p. 326-346, 2005.

MORONA, R.; KLOSE, M.; HENNING, U. *Escherichia coli* K-12 outer membrane protein (OmpA) as a bacteriophage receptor: analysis of mutant genes expressing altered proteins. **J. Bacteriol.**, v. 159, n. 2, p. 570-578, 1984.

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

MUNSON, R. S.; GRASS, S.; WEST, R. Molecular cloning and sequence of the gene for the outer membrane protein P5 of *Haemophilus influenzae*. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 9, p. 4017-4020, 1993.

MURPHY, P. M.; TIFFANY, H. L. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. **Science**, v. 253, p. 1280-1283, 1991.

NAGATA, S. Apoptosis by death factor. **Cell**, v. 88, p. 355-365, 1997.

NAGATA, S.; SUDA, T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. **Immunol. Today**, v. 16, n. 1, p. 39-43, 1995.

NAGATA, S.; GOLSTEIN, P. The Fas death factor. **Science**, v. 267, n. 5203, p. 1449-1456, 1995.

NAKANISHI, K.; YOSHIMOTO, T.; TSUTSUI, H.; OKAMURA, H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v.19, p. 423-474, 2001.

NAKAO, M.; TSUJIKURA, M.; ICHIKI, S.; VO, T. K.; SOMAMOTO, T. The complement system in teleost fish: Progress of post-homolog-hunting researches. Developmental and comparative. **Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1296-1308, 2011.

NASSAR, C. A.; NASSAR, P. O.; NASSAR, P. M.; SPOLIDORIO, L. C. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents bone resorption. **Braz. Oral Res.**, v. 19, p. 36-40, 2005.

NAKANO, K.; INABA, H.; NOMURA, R.; NEMOTO, H.; TAMURA, K.; MIYAMOTO, E.; YOSHIOKA, H.; TANIGUCHI, K.; AMANO, A.; OOSHIMA, T. Detection and serotype distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in cardiovascular specimens from Japanese patients. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 22, p. 136-139, 2007.

NIKAIDO, H. Isolation of outer membranes. In: CLARK V. L.; BAVOIL, P. M. (Ed.). **Bacterial Pathogenesis: selected methods in enzymology**. San Diego, C.A.: Academic Press, 1997. p. 113-122.

NG, J.; HIROTA, S. A.; GROSS, O.; LI, Y.; ULKE-LEMEE, A.; POTENTIER, M. S.; SCHENCK, L. P.; VILAYSANE, A.; SEAMONE, M. E.; FENG, H.; ARMSTRONG, G. D.; TSCHOPP, J.; MACDONALD, J. A.; MURUVE, D. A.; BECK, P. L. *Clostridium difficile* toxin-induced inflammation and intestinal injury are mediated by the inflammasome. **Gastroenterology**, v. 139, n. 2, p. 542-552, 2010.

NOGUCHI, T.; SHIBA, H.; KOMATSUZAWA, H.; MIZUNO, N.; UCHIDA, Y.; OUHARA, K.; ASAKAWA, R.; KUDO, S.; KAWAGUCHI, H.; SUGAI, M.; KURIHARA H. Syntheses of prostaglandin E2 and E-cadherin and gene expression of beta-defensin-2 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, **Inflammation**, v. 27, n. 6, p. 341-349, 2003.

NONAKA, M.; SMITH, S. L. Complement system of bony and cartilaginous fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 10, n. 3, p. 215-228, 2000.

OGAWA, S.; LOZACH, J.; BENNER, C.; PASCUAL, G.; TANGIRALA, R. K.; WESTIN, S.; HOFFMANN, A.; SUBRAMANIAM, S.; DAVID, M.; ROSENFELD, M. G.; GLASS, C. K. Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and Toll-like receptors. **Cell**, v. 122, n. 5, 707-721, 2005.

OGURA, Y.; SUTTERWALA, F. S.; FLAVELL, R. A. The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 659-662, 2006.

OFORI-DARKO, E.; ZAVROS, Y.; RIEDER, G.; TARLÉ, S. A.; VAN ANTWERP, M.; MERCHANT, J. L. An OmpA-like protein from *Acinetobacter* spp. stimulates gastrin and interleukin-8 promoters. **Infect Immun.**, v. 68, n. 6, p. 3657-3666, 2000.

OKUGAWA, T.; KANEKO, T.; YOSHIMURA, A.; SILVERMAN, N.; HARA, Y. NOD1 and NOD2 mediate sensing of periodontal pathogens. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 2, p. 186-191, 2010.

OSHIMI, Y.; ODA, S.; HONDA, Y.; NAGATA, S.; MIYAZAKI, S. Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. **J Immunol.**, v. 157, n. 7, p. 2909-2915, 1996.

OROZCO, A.; GEMMELL, E.; BICKEL, M.; SEYMOUR, G. J. Interleukin-1 β , interleukin-12 and interleukin-18 levels in gingival fluid and serum of patients with

gingivitis and periodontitis. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 21, n. 4, p. 256-260, 2006.

OZÇAKA, O.; NALBANTSOY, A.; BUDUNELI, N. Interleukin-17 and interleukin-18 levels in saliva and plasma of patients with chronic periodontitis. **J. Periodontal Res.**, v. 46, n. 5, p. 592-598, 2011.

OWENS, J. M.; GALLAGHER, A. C.; CHAMBERS, T. J. IL-10 modulates formation of osteoclasts in murine hemopoietic cultures. **J. Immunol.**, v. 157, n. 2, p. 936-940, 1996.

PABLOS ALVAREZ, J. L. Interleukin 6 in the physiopathology of rheumatoid arthritis. **Reumatol. Clin.**, v. 5, n. 1, p. 34-39, 2009.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.** v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

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

PALM, N. W.; DE ZOETE, M. R.; FLAVELL, R. A. Immune-microbiota interactions in health and disease. **Clin. Immunol.**, v. 159, n. 2, p. 122-127, 2015.

PANKOV, R.; YAMADA, K. M. Fibronectin at a glance. **J. Cell Sci.**, v. 115, p. 3861-3863, 2002.

PAPADAKIS, K. A.; TARGAN, S. R. Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. **Gastroenterology**, v. 119, n. 4, p. 1148-1157, 2000.

PARK, E.; NA, H. S.; SONG, Y. R.; SHIN, S. Y.; KIM, Y. M.; CHUNG, J. Activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes by *Porphyromonas gingivalis* infection. **Infect. Immun.**, v. 82, n. 1, p. 112-123, 2014.

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

PFEIFHOFER, C.; KOFLER K.; GRUBER, T.; TABRIZI, N. G.; LUTZ, C.; MALY, K.; LEITGES, M.; BAIER, G. Protein kinase C α affects Ca²⁺ mobilization and NFAT cell activation in primary mouse T cells. **J. Exp. Med.**, v. 197, n. 11, p. 1525-1535, 2003.

PICK-KOBER, K. H.; MUNKER, D.; GRESSNER, A. M. Fibronectin is synthesised as an acute phase reactant in rat hepatocytes. **J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, v. 24, n. 8, p. 521-528, 1986.

PINHEIRO, E. T.; KAWAMOTO, D.; OTA-TSUZUKI, C.; ALMEIDA, L. R.; NUNES, A. C.; LONGO, P. L.; WIKSTROM, M.; MAYER, M. P. Analysis of genotypic variation in genes associated with virulence in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* clinical isolates. **J. Periodontal Res.**, v. 46, n. 3, p. 310-317, 2011.

PINHO MDE, N.; PEREIRA, L. B.; DE SOUZA, S. L.; PALIOTO, D. B.; GRISI, M. F.; NOVAES, A. B. JR.; TABA, M. JR. Short-term effect of COX-2 selective inhibitor as an adjunct for the treatment of periodontal disease: a clinical double-blind study in humans. **Braz. Dent. J.**, v. 19, n. 4, p. 323-328, 2008

PUOHINIEMI, R.; KARVONEN, M.; VUOPIO-VARKILA, J.; MUOTIALA, A.; HELANDER, I. M.; SARVAS, M. A strong antibody response to the periplasmic C-terminal domain of the OmpA protein of *Escherichia coli* is produced by immunization with purified OmpA or with whole *E. coli* or *Salmonella* Typhimurium bacteria. **Infect. Immun.**, v. 58, n. 6, p. 1691-1696, 1990.

PRADEEP, A. R.; SUKE, D. K.; PRASAD, M. V.; SINGH, S. P.; MARTANDE, S. S.; NAGPAL, K.; NAIK, S. B.; GURUPRASAD, C. N.; RAJU, A. P.; SINGH, P.; SIDDAYA, M. Expression of key executioner of apoptosis caspase-3 in periodontal health and disease. **J. Investig. Clin. Dent.**, 2014. In press.

PRESHAW, P. M.; TAYLOR, J. J. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? **J. Clin. Periodontol.**, v. 38, p. 60-84, 2011. Suplemento 11.

QU, Y.; CHEN, Q.; LAI, X.; ZHU, C.; CHEN, C.; ZHAO, X.; DENG, R.; XU, M.; YUAN, H.; WANG, Y.; YU, J.; HUANG, J. SUMOylation of Grb2 enhances the ERK activity by increasing its binding with Sos1. **Mol. Cancer**, v. 13, p. 95, 2014.

QUANTE, T.; NG, Y. C.; RAMSAY, E. E.; HENNESS, S.; ALLEN, J. C.; PARMENTIER, J.; GE, Q.; AMMIT, A. J. Corticosteroids reduce IL-6 in ASM cells via up-regulation of MKP-1. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 39, n. 2, 208-217, 2008.

RAMS, T. E.; LISTGARTEN, M. A.; SLOTS, J. *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* subgingival presence, species-specific serum immunoglobulin G antibody levels, and periodontitis disease recurrence. **J. Periodontal Res.**, v. 41 n. 3, p. 228-234, 2006.

RAMSEIER, C. A.; KINNEY, J. S.; HERR, A.E.; BRAUN, T.; SUGAI, J. V.; SHELBURNE, C. A.; RAYBURN, L. A.; TRAN, H. M.; SINGH, A. K.; GIANNOBILE, W. V. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 80, n. 3, p. 436-446, 2009.

RAKESH, K.; AGRAWAL, D. K. Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors. **Biochem. Pharmacol.**, v. 70, n. 5, p. 649-657, 2005.

RAKIĆ, M.; ZELIĆ, K.; PAVLICA, D.; HADZIMIHAJLOVIĆ, M.; MILASIN, J.; MILIĆIĆ, B.; NIKOLIĆ, N.; STAMATOVIĆ, N.; MATIĆ, S.; ALEKSIĆ, Z.; JANKOVIĆ, S. Association between clinical parameters and the presence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in patients with progressive periodontal lesions. **Vojnosanit Pregl.**, v. 67, n. 11, p. 898-902, 2010.

RICE, G. E.; MUNRO, J. M.; BEVILACQUA, M. P. Inducible cell adhesion molecule 110 (INCAM-110) is an endothelial receptor for lymphocytes. A CD11/CD18-independent adhesion mechanism. **J. Exp. Med.**, v. 171, n. 4, p. 1369-1374, 1990.

ROSEN, A.; CASCIOLA-ROSEN, L. Macromolecular substrates for the ICE-like proteases during apoptosis. **J. Cell Biochem.**, v. 64, n. 1, p. 50-54, 1997.

RYLEV, M.; KILIAN, M. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. **J. Clin. Periodontol.**, v. 35, p 346-361, 2008. Suplemento 8.

SAARELA, M.; ASIKAINEN, S.; ALALUUSUA, S.; PYHÄLÄ, L.; LAI, C. H.; JOUSIMIES-SOMER, H. Frequency and stability of mono- or polyinfection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, b, c, d or e. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 7, n. 5, p. 277-279, 1992.

SAGLIE, F. R.; CARRANZA, F. A. JR.; NEWMAN, M. G.; CHENG, L.; LEWIN, K. J. Identification of tissue-invading bacteria in human periodontal disease. **J. Periodont. Res.**, v. 17, n. 5, p. 452-455, 1982.

SAHOO, M.; CEBALLOS-OLVERA, I.; DEL BARRIO, L.; RE, F. Role of the inflammasome, IL-1 β , and IL-18 in bacterial infections. **Scientific World Journal**, v. 11, p. 2037-2050, 2011.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANDIG, H.; MCDONALD, J.; GILMOUR, J.; ARNO, M.; LEE, T. H.; COUSINS, D.J. Fibronectin is a TH1-specific molecule in human subjects. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 124, n. 3, p. 528-535, 2009.

SANDT, C. H.; HILL, C. W. Four different genes responsible for nonimmune immunoglobulin-binding activities within a single strain of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.68, n. 4, p. 2205-2214. 2000.

SANTORO, M. M.; SAMUEL, T.; MITCHELL, T.; REED, J. C.; STAINIER, D. Y. Birc2 (clap1) regulates endothelial cell integrity and blood vessel homeostasis. **Nat. Genet.**, v. 39, n. 11, p. 1397-1402, 2007.

SECOMBES, C. J. The nonspecific immune system: cellular defenses. In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. (Ed.). **The fish immune system**. London: Academic Press, 1996. p. 95-103.

SELVARAJ, S. K.; PRASADARAO, N. V. *Escherichia coli* K1 inhibits proinflammatory cytokine induction in monocytes by preventing NF-kappaB activation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 78, n. 2, p. 544-554, 2005.

SCHEIDEREIT, C. I κ B kinase complexes: Gateways to NF-kB activation and transcription. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6685-6705, 2006.

SCHULTE, S.; SUKHOVA, G. K.; LIBBY, P. Genetically programmed biases in Th1 and Th2 immune responses modulate atherogenesis. **Am. J. Pathol.**, v. 172, n. 6, p. 1500-1508, 2008.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821-832, 2010.

SCHWARZ-LINEK, U.; HOOK, M.; POTTS, J. R. Fibronectin binding proteins of Gram-positive cocci. **Microbes Infect.**, v. 8, n. 8, p. 2291-2298, 2006.

SHACHAR, I.; FLAVELL, R. A. Requirement for invariant chain in B cell maturation and function. **Science**, v. 274, n. 5284, p. 106-108, 1996.

SHENG, M.; GREENBERG, M. E. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. **Neuron**, v. 4, n. 4, p. 477-485, 1990.

SHENKER, B. J.; WALKER, L. P.; ZEKAVAT, A.; BOESZE-BATTAGLIA, K. Lymphoid susceptibility to the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin is dependent upon baseline levels of the signaling lipid, phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate. **Mol. Oral Microbiol.**, 2015a. In press.

SHENKER, B. J.; BOESZE-BATTAGLIA, K.; SCURON, M. D.; WALKER, L. P.; ZEKAVAT, A.; DLAKIĆ, M. The toxicity of the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin correlates with its phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate phosphatase activity. **Cell Microbiol.**, 2015b. In press.

SHI, X.; LENG, L.; WANG, T.; WANG, W.; DU, X.; LI, J.; MCDONALD, C.; CHEN, Z.; MURPHY, J. W.; LOLIS, E.; NOBLE, P.; KNUDSON, W.; BUCALA, R. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. **Immunity**, v. 25, n. 4, p. 595-606, 2006.

SHINJI, H.; SAKURADA, J.; SEKI, K.; MURAI, M.; MASUDA, S. Different effects of fibronectin on the phagocytosis of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci by murine peritoneal macrophages. **Microbiol. Immunol.**, v. 42, n. 12, p. 851-861, 1998.

SHINJI, H.; KAMADA, M.; SEKI, K.; TAJIMA, A.; IWASE, T.; MASUDA, S. Expression and distribution of very late antigen-5 in mouse peritoneal macrophages upon ingestion of fibronectin bound *Staphylococcus aureus*. **Microbiol. Immunol.**, 51, n. 1, p. 63-71, 2007.

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

SMITH, M. L.; GOURDON, D.; LITTLE, W. C.; KUBOW, K. E.; EGUILUZ, R. A.; LUNA-MORRIS, S.; VOGEL, V. Force-induced unfolding of fibronectin in the extracellular matrix of living cells. **PLoS Biol.**, v. 5, n. 10, p. e268, 2007b.

SOCRANSKY, S. S. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. **J. Dent. Res.**, v. 49, n. 2, p. 203-222, 1970.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. **Periodontology 2000**, v. 5, p. 7-25, 1994.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; SMITH, C.; KENT, JR. R. L. Microbial complexes in subgingival plaque. **J. Clin. Periodontol.**, v. 25, n. 2, p. 134-144, 1998.

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

SORKIN, B. C.; NIEDERMAN, R. Short chain carboxylic acids decrease human gingival keratinocyte proliferation and increase apoptosis and necrosis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 25, n. 4, p. 311-315, 1998.

SPAHICH, N. A.; KENJALE, R.; MCCANN, J.; MENG, G.; OHASHI, T.; ERICKSON H. P.; ST GEME, J. W. 3RD. Structural determinants of the interaction between the *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter and fibronectin. **Microbiology**, v. 160, p. 1182-1190, 2004.

STARR, R.; WILLSON, T. A.; VINEY, E. M.; MURRAY, L. J.; RAYNER, J. R.; JENKINS, B. J.; GONDA, T. J.; ALEXANDER, W. S.; METCALF, D.; NICOLA, N. A.; HILTON, D. J. A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling. **Nature**, v. 387, n. 6636, p. 917-921, 1997.

STASHENKO, P.; DEWHIRST, F. E.; PEROS, W. J.; KENT, R. L.; AGO, J. M. Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. **J. Immunol.**, v. 138, n. 5, p. 1464-1468, 1987.

STEINBERG, S. F. Structural basis of protein kinase C isoform function. **Physiol. Rev.**, 88, n. 4, p. 1341-1378, 2008.

STEWART-TULL, D. E. The immunological activities of bacterial peptidoglycans. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 34, p. 311-340, 1980.

SODERQUIST, B.; ALRIKSSON, I.; KALLMAN, J.; KIHLLSTROM, E. The influence of adhesive and invasive properties of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins on secretion of interleukin-6 by human endothelial cells. **APMIS**, v. 114, n. 2, p. 112-116, 2006.

SUGAWARA, S.; UEHARA, A.; NOCHI, T.; YAMAGUCHI, T.; UEDA, H.; SUGIYAMA, A.; HANZAWA, K.; KUMAGAI, K.; OKAMURA, H.; TAKADA, H. Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells. **J. Immunol.**, v. 167, n. 11, p. 6568-6575, 2001.

SUGAWARA, Y.; UEHARA, A.; FUJIMOTO, Y.; KUSUMOTO, S.; FUKASE, K.; SHIBATA, K.; SUGAWARA, S.; SASANO, T.; TAKADA, H. Toll-like receptors, NOD1, and NOD2 in oral epithelial cells. **J. Dent. Res.**, v. 85, n. 6, p. 524-529, 2006.

SUN, Z.; ARENDT, C. W.; ELLMEIER, W.; SCHAEFFER, E. M.; SUNSHINE, M. J.; GANDHI, L.; ANNES, J.; PETRZILKA, D.; KUPFER, A.; SCHWARTZBERG, P. L.; LITTMAN, D. R. PKC-theta is required for TCR-induced NF-kB activation in mature but not immature T lymphocytes. **Nature**, v. 404, n. 6776, p. 402-407, 2000.

SWANT, J. D.; RENDON, B. E.; SYMONS, M.; MITCHELL, R. A. Rho GTPase-dependent signaling is required for macrophage migration inhibitory factor-mediated expression of cyclin D1. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 24, p. 23066-23072, 2005.

TABETA, K.; YAMAZAKI, K.; AKASHI, S.; MIYAKE, K.; KUMADA, H.; UMEMOTO, T.; YOSHIE, H. Toll-like receptors confer responsiveness to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 6, p. 3731-3735, 2000.

TAICHMAN, D. B.; CYBULSKY, M. I.; DJAFFAR, I.; LONGENECKER, B. M.; TEIXIDO, J.; RICE, G. E.; ARUFFO, A.; BEVILACQUA, M. P. Tumor cell surface alpha 4 beta 1 integrin mediates adhesion to vascular endothelium: demonstration of an interaction with the N-terminal domains of INCAM-110/VCAM-1. **Cell Regul.**, v. 2, n. 5, p. 347-356, 1991.

TANG, G.; KAWAI, T.; KOMATSUZAWA, H.; MINTZ, K. P. Lipopolysaccharides mediate leukotoxin secretion in *Aggregatibacter actinomycetem comitans*. **Mol. Oral Microbiol.**, v. 27, n. 2, p. 70-82, 2012.

TEIXEIRA, R. E.; MENDES, E. N.; CARVALHO, M. A. R.; NICOLI, J. R.; FARIAS, L. M.; MAGALHÃES, P. P. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype specific genotypes and periodontal status in Brazilian subjects. **Can. J. Microbiol.**, v. 52, n. 3, p. 182-188, 2006.

THORNBERRY, N. A.; BULL, H. G.; CALAYCAY, J. R.; CHAPMAN, K. T.; HOWARD, A. D.; KOSTURA, M. J.; MILLER, D. K.; MOLINEAUX, S. M.; WEIDNER, J. R.; AUNINS, J.; ELLISTON, K. O.; AYALA, J. M.; CASANO, F. J.; CHIN, J.; DING, G. J. J. F.; EGGER, L. A.; GAFFNEY, E. P.; LIMJUCO, G.; PALYHA, O. C.; RAJU, S. M.; TREBAUL, A.; CHAN, E. K.; MIDWOOD, K. S. Regulation of fibroblast migration by tenascin-C. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 35, p. 695-697, 2007.

TILLET, W. S.; FRANCIS, T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. **J. Exp. Med.**, v. 52, n. 4, p. 561-571, 1930.

TINOCO, E. M.; LYGSTADAAS, S. P.; PREUS, H. R.; GJERMO, P. Attachment loss and serum antibody levels against autologous and reference strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in untreated localized juvenile periodontitis patients. **J. Clin. Periodontol.**, v. 24, n. 12, p. 937-944, 1997.

TOMASINI-JOHANSSON, B. R.; KAUFMAN, N. R.; ENSENBERGER, M. G.; OZERI, V.; HANSKI, E.; MOSHER, D. F. A 49-residue peptide from adheisin F1 of

Streptococcus pyogenes inhibits fibronectin matrix assembly. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 26, p. 23430-23439, 2001.

TØONJUM, T.; BUKHOLM, G.; BØOVRE, K. Identification of *Haemophilus aphrophilus* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by DNA-DNA hybridization and genetic transformation. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, n. 9, p. 1994-1998, 1990.

TORRES, A. G.; LI, Y.; TUTT, C. B.; XIN, L.; EAVES-PYLES, T.; SOONG, L. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* O157:H7 stimulates dendritic cell activation. **Infect Immun.**, v. 74, n. 5, p. 2676-2685, 2006.

TRINCHIERI, G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-g). **Curr. Opin. Immunol.**, v. 9, p. 17-23, 1997.

TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. Interleukin-12: basic principles and clinical applications. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 238, p. 59-78, 1999.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 2, p. 133-146, 2003.

TSAI, I. S.; TSAI, C. C.; HO, Y. P.; HO, K. Y.; WU, Y. M.; HUNG, C. C. Interleukin-12 and interleukin-16 in periodontal disease. **Cytokine**, v. 31, n. 1, p. 34-40, 2005.

TSCHOPP, J.; IRMLER, M.; THOME, M. Inhibition of fas death signals by FLIPs. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 10, n. 5, p. 552-558, 1998.

UCHIDA, Y.; SHIBA, H.; KOMATSUZAWA, H.; TAKEMOTO, T.; SAKATA, M.; FUJITA, T.; KAWAGUCHI, H.; SUGAI, M.; KURIHARA, H. Expression of IL-1 beta and IL-8 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Cytokine**, v. 14, n. 3, p. 152-161, 2001.

UCHIDA, Y.; SHIBA, H.; KOMATSUZAWA, H.; HIRONO, C.; ASHIKAGA, A.; FUJITA, T.; KAWAGUCHI, H.; SUGAI, M.; SHIBA, Y.; KURIHARA, H. Irsogladine maleate influences the response of gap junctional intercellular communication and IL-8 of human gingival epithelial cells following periodontopathogenic bacterial challenge. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 333, n. 2, p. 502-507, 2005.

UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N.; KATAGIRI, T.; TAMURA, T.; WADA, S.; FINDLAY, D. M.; MARTIN, T. J.; HIROTA, H.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T.; SUDA, T. Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 5, p. 1461-1468, 1995.

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

UMEDA, J. E.; LONGO, P. L.; SIMIONATO, M. R.; MAYER, M. P. Differential transcription of virulence genes in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes. **J. Oral Microbiol.**, 2013. In press.

UMEDA, J. E.; DEMUTH, D. R.; ANDO E. S.; FAVERI, M.; MAYER, M. P. A. Signaling transduction analysis in gingival epithelial cells after infection with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Mol. Oral Microbiol.**, v. 27, n. 1, p. 23-33, 2012.

VALIÑO-RIVAS, L.; BAEZA-BERMEJILLO, C.; GONZALEZ-LAFUENTE, L.; SANZ, A. B.; ORTIZ, A.; SANCHEZ-NIÑO, M. D. CD74 in kidney disease. **Front. Immunol.**, v. 6, p. 1-8, 2015.

VAN ALPHEN, L.; HAVEKES, L.; LUGTENBERG, B. OmpA major outer membrane protein d of *Escherichia coli* K12. **FEBS Lett.**, v. 75, p. 285-290, 1977.

VAN ESSCHE, M.; LOOZEN, G.; GODTS, C.; BOON, N.; PAUWELS, M.; QUIRYNEN, M.; TEUGHEL, W. Bacterial antagonism against periodontopathogens. **J Periodontol.**, v. 84, n. 6, p. 801-811, 2013.

VAN PARIJS, L.; IBRAGHIMOV, A.; ABBAS, A.K. The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. **Immunity**, v. 4, n. 3, p. 321-328, 1996.

VAN PUTTEN, J. P.; DUENSING, T. D.; COLE, R. L. Entry of OpaA+ gonococci into HEp-2 cells requires concerted action of glycosaminoglycans, fibronectin and integrin receptors. **Mol. Microbiol.**, v. 29, n. 1, p. 369-379, 1998.

VANDEN BERGHE, T.; LINKERMANN, A.; JOUAN-LANHOUE, S.; WALCZAK, H.; VANDENABEELE, P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 15, p. 135-147, 2014.

VANGESTEL, C.; VAN DE WIELE, C.; MEES, G.; PEETERS, M. Forcing cancer cells to commit suicide. **Cancer Biother. Radiopharm.**, v. 24, n. 4, p. 395-407, 2009.

VIALA, J.; CHAPUT, C.; BONECA, I. G.; CARDONA, A.; GIRARDIN, S. E.; MORAN, A. P.; ATHMAN, R.; MÉMET, S.; HUERRE, M. R.; COYLE, A. J.; DISTEFANO, P. S.; SANSONETTI, P. J.; LABIGNE, A.; BERTIN, J.; PHILPOTT, D. J.; FERRERO, R. L. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. **Nat. Immunol.**, v. 5, p. 1166-1174, 2004.

VOGEL, H.; JAHNIG, F. Models for the structure of outer-membrane proteins of *Escherichia coli* derived from Raman spectroscopy and prediction methods. **J. Mol. Biol.**, v. 190, p. 191-199, 1986.

VARFOLOMEEV, E.; GONCHAROV, T.; FEDOROVA, A. V.; DYNEK, J. N.; ZOBEL, K.; DESHAYES, K.; FAIRBROTHER, W. J.; VUCIC, D. c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-KB activation. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 24295-24299, 2008.

WAGNER, E. F.; EFERL, R. Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. **Immunol. Rev.**, v. 208, p. 126-140, 2005.

WAGNER, E. F.; NEBREDA, A. R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. **Nat. Rev. Cancer**, v. 9, n. 8, p. 537-549, 2009.

WALLACH, D.; ARUMUGAM, T. U.; BOLDIN, M. P.; CANTARELLA, G.; GANESH, K. A.; GOLTSEV, Y.; GONCHAROV, T. M.; KOVALENKO, A. V.; RAJPUT, A.; VARFOLOMEEV, E. E.; ZHANG, S. Q. How are the regulators regulated? The search for mechanisms that impose specificity on induction of cell death and NF- κ B activation by members of the TNF/NGF receptor family. **Arthritis Res.**, v. 4, p. 189-196, 2002. Suplemento 3.

WANG, C. Y.; MAYO, M. W.; KORNELUK, R. G.; GOEDEL, D. V.; BALDWIN, A. S. JR. NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. **Science**, v. 281, n. 5383, p. 1680-1683, 1998.

WANG, Y.; GOODMAN, S. D.; REDFIELD, R. J.; CHEN, C. Natural transformation and DNA uptake signal sequences in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Bacteriol.**, v.184, n. 13, p. 3442-3449, 2002.

WATANABE, H.; MARSH, P. D.; IVANYI, L. Antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* identified by immunoblotting with sera from patients with localized human juvenile periodontitis and generalized severe periodontitis. **Arch. Oral Biol.**, v. 34, n. 8, p. 649-656, 1989.

WESTLING, K.; VONDRACEK, M. *Actinobacillus (Aggregatibacter) actinomycetemcomitans* (HACEK) identified by PCR/16S rRNA sequence analysis from the heart valve in a patient with blood culture negative endocarditis. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 40, n. 11-12, p. 981-983, 2008.

WILENSKY, A.; SEGEV, H.; MIZRAJI, G.; SHAUL, Y.; CAPUCHA, T.; SHACHAM, M.; HOVAV, A. H. Dendritic cells and their role in periodontal disease. **Oral Dis.**, v. 20, n. 2, p. 119-126, 2014.

WILSON, M. E. The heat modifiable outer membrane protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: relationship to ompA proteins. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 7, 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, n. 3, p. 211-218, 1991b.

WILSON, M. E.; HAMILTON, R. G. Immunoglobulin G subclass response of juvenile periodontitis subjects to principle outer membrane proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 3, p. 1062-1069, 1995.

WILSON, M. E.; SCHIFFERLE, R. E. Evidence that the serotype b antigenic determinant of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 resides in the polysaccharide moiety of lipopolysaccharide. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 4, p. 1544-1551, 1991.

WUYTS, A.; VAN OSSELAER, N.; HAELENS, A.; SAMSON, I.; HERDEWIJN, P.; BEN-BARUCH, A.; OPPENHEIM, J.J.; PROOST, P.; VAN DAMME, J. Characterization of synthetic human granulocyte chemotactic protein 2: usage of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 and in vivo inflammatory properties. **Biochemistry**, v. 36, n. 9, p. 2716-2723, 1997.

YAMADA, K. M.; PANKOV, R.; CUKIERMAN, E. Dimensions and dynamics in integrin function. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, n. 8, p. 959-966, 2003.

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

YAO, L.; BENGUALID, V.; LOWY, F. D.; GIBBONS, J. J.; HATCHER, V. B.; BERMAN, J. W. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression. **Infect Immun.**, v. 63, n. 5, p. 1835-1839, 1995.

YEN, C. A.; DAMOULIS, P. D.; STARK, P. C.; HIBBERD, P. L.; SINGH, M.; PAPAS, A. S. The effect of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor (celecoxib) on chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 79, n. 1, p. 104-113, 2008.

YILMAZ, O.; WATANABE, K.; LAMONT, R. J. Involvement of integrins in fimbriae-mediated binding and invasion by *Porphyromonas gingivalis*. **Cell. Microbiol.**, v. 4, n. 5, p. 305-314, 2002.

YOSHIMURA, A.; LIEN, E.; INGALLS, R. R.; TUOMANEN, E.; DZIARSKI, R.; GOLENBOCK, D. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. **J. Immunol.**, v. 163, n. 1, p. 1-5, 1999.

YOSHIMURA, A.; NAKA, T.; KUBO, M. SOCS proteins, cytokine signaling and immune regulation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 6, p. 454-465, 2007.

YUCEL, O.O.; BERKER, E.; GARIBOGLU, S.; OTLU, H. Interleukin-11, interleukin-1 β , interleukin-12 and the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, v. 35, n. 5, p. 365-370, 2008.

XIE, W. L.; CHIPMAN, J. G.; ROBERTSON, D. L.; ERIKSON, R.; SIMMONS, D. L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, n. 7, p. 2692-2696, 1991.

ZAMBON, J. J.; CHRISTERSSON, L. A.; SLOTS, J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. **J. Periodontol.**, v. 54, p. 707-711, 1983.

ZAMIR, E.; GEIGER, B. Components of cell-matrix adhesions. **J. Cell Sci.**, v. 114, p. 3577-3579, 2001.

ZHANG, X.; ALNAEELI, M.; SINGH, B.; TENG, Y. T. Involvement of SOCS3 in regulation of CD11c+ dendritic cell-derived osteoclastogenesis and severe alveolar bone loss. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 5, p. 2000-2009, 2009.

ZHONG, H.; MAY, M. J.; JIMI, E.; GHOSH, S. The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. **Mol. Cell.**, v. 9, n. 3, p. 625-636, 2002.

ZYCHLINSKY, A.; PREVOST, M.; SANSONETTI, P. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. **Nature**, v. 358, n. 6382, p. 167-169, 1992.