PRISCILA LARCHER LONGO

CONSTRUÇÃO, ANÁLISE DO FENÓTIPO
E DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DE UMA AMOSTRA
MUTANTE DE *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
DEFICIENTE EM *arcB*

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

Área de concentração: Microbiologia
Orientadora: Prof^ª Dr^ª Marcia P. A. Mayer

São Paulo
2008

RESUMO

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

Aggregatibacter actinomycetemcomitans é periodontopatogênico que possui diversos fatores de virulência, porém, pouco se sabe sobre a sua regulação. O sistema de dois componentes ArcAB é responsável por perceber as condições de oxigênio do ambiente e em *A. actinomycetemcomitans* está associado à aquisição de ferro. O objetivo deste estudo foi construir uma amostra de *A. actinomycetemcomitans* deficiente em *arcB* e comparar as suas características fenotípicas e de transcrição gênica com as da amostra selvagem. O gene *arcB* de *A. actinomycetemcomitans* foi interrompido pela inserção de um gene de resistência a espectinomicina empregando um sistema de conjugação. As amostras foram analisadas quanto ao crescimento, adesão e invasão em células epiteliais KB, adesão à hidroxiapatita recoberta por saliva (SHA) e formação de biofilme, após cultivo sob atmosfera de microaerofilia e anaerobiose. A análise da expressão de genes foi determinada por RT PCR em tempo real. As amostras mostraram crescimento similar em condições de microaerofilia e anaerobiose em meio enriquecido. A amostra mutante, cultivada em microaerofilia apresentou menor capacidade de adesão às células KB, porém, quando cultivada até início de fase exponencial em anaerobiose mostrou comportamento inverso. As amostras apresentaram comportamento diferenciado na capacidade de invasão às células KB, indicando que o sistema ArcAB participa não somente da regulação de genes associados a adesão, mas também de outros relacionados a entrada e sobrevivência intracelular do microrganismo. Houve diferença na hidrofobicidade celular das amostras. Foi possível observar que a atmosfera de incubação e a fase da cultura influenciaram no comportamento hidrofóbico, sugerindo que ArcB não seria receptor apenas para a condição de oxidação do ambiente, mas outros sinais estariam sendo diferencialmente percebidos pelas amostras mutante e selvagem. A mutante exibiu capacidade reduzida de adesão à SHA quando comparada à amostra selvagem e as amostras também apresentaram formação diferenciada de biofilme. A análise da expressão gênica mostrou que o sistema ArcAB participa da regulação gênica dos genes *omp29*, *cdtB*, *apaH* e *vppA*. Os fenótipos diferenciais entre as amostras selvagem e mutante *arcB* deficiente indicam que ArcB está envolvido na expressão de características associadas a adesão e invasão à células epiteliais, adesão à SHA, hidrofobicidade celular, formação de biofilme e está associado direta ou indiretamente à regulação de genes em *A. actinomycetemcomitans*. Os dados sugerem que ArcB participa da regulação de fatores associados a virulência de *A. actinomycetemcomitans*.

Palavras-chave: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *arcB*; Adesão; Biofilme; PCR em Tempo Real.

ABSTRACT

LONGO, P.L. **Construction, phenotypic and gene transcription analysis of an *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mutant strain deficient in *arcB***. 2008. 112p. Ph. D. Thesis - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans is a periodontopathogen that possess several virulence factors, but little is known about their regulation. The ArcAB two components system is responsible to sense oxygen environmental conditions and in *A. actinomycetemcomitans* is associated with iron uptake. This study aimed to construct an *arcB* deficient strain of *A. actinomycetemcomitans* and to compare its phenotypical traits and gene transcription with the wild strain. The *arcB* gene of *A. actinomycetemcomitans* was disrupted by the insertion of a spectinomycin resistance gene by using a conjugation system. The strains were evaluated concerning growth curve, adhesion and invasion in KB epithelial cells, adhesion to saliva coated hydroxiapatite (SHA) and biofilm formation after growth under microaerophilic and anaerobic atmospheres. Gene expression analyses were performed by real time RT-PCR. The strains showed a similar pattern of growth in enriched medium under microaerophilic or anaerobic atmospheres. When grown under microaerophilic atmosphere, the mutant strain exhibited decreased adhesion ability to KB cells, however a different behavior was seen in early log phase under anaerobic incubation. The strains also showed a differential behavior in the invasion ability to KB cells, indicating that ArcAB is involved not only in the regulation of genes related to adhesion but also in others related to intracellular entry and survival. A difference in the cells hydrophobic properties was shown. The incubation atmosphere and culture growth phase had an influence in the hydrophobic properties, suggesting that ArcB is not only a receptor which senses environmental oxygen, but other signals are also differentially sensed by the mutant and wild strains. The mutant strain exhibited a reduced ability to adhere to saliva coated hydroxiapatite when compared to the wild type, and the strains had also exhibited differences in biofilm formation. Gene expression analyses showed that the ArcAB system is involved on the regulation of *omp29*, *cdtB*, *apaH* and *vppA*. The differential phenotypes between the *arcB* deficient and the wild strain indicated that ArcB is involved in the expression of phenotypes associated to adhesion and invasion to epithelial cells, adhesion to SHA, cellular hydrophobicity and biofilm formation. ArcB is directly or indirectly associated with the regulation of genes in *A. actinomycetemcomitans*. These data suggest that ArcB is involved in the regulation of factors associated with the virulence of *A. actinomycetemcomitans*.

Key-words: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *arcB*; Adhesion; Biofilm; Real Time PCR.

1 INTRODUÇÃO

A periodontite agressiva é uma infecção que acomete indivíduos sistemicamente saudáveis, caracterizada por uma grande perda de inserção clínica associada a uma rápida destruição óssea alveolar, acometendo normalmente pacientes jovens (ARMITAGE, 1999; TONETTI; MOMBELI, 1999).

Entre os microrganismos relacionados à etiologia das doenças periodontais destaca-se *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (anteriormente classificado como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) (HAUBEK et al., 2001; NORSKOV-LAURITSEN; KILIAN, 2006).

A. actinomycetemcomitans é um pequeno cocobacilo, gram negativo, capnofílico, da família *Pasteurellaceae*. Além de estar relacionado às doenças periodontais, o microrganismo também pode ser associado a outras infecções em humanos como endocardites, septicemias, meningites, abscessos cerebrais e infecções do trato urinário (ZAMBON et al., 1988; SILVA et al., 1990; KAPLAN; FINE, 1998).

As amostras de *A. actinomycetemcomitans* são classificadas em 06 sorotipos (a, b, c, d, e, f) definidos por seus polissacarídeos de superfície (KAPLAN et al., 2002). O microrganismo possui transmissão intrafamiliar (ZAMBON et al., 1983) e sua prevalência varia entre diversas populações, evidenciando que as raças ou etnias possuem fator de risco potencial diferente para sua colonização (HAUBEK et al., 1996; HAUBEK et al., 1997; UMEDA et al., 1998; TAN et al., 2001).

O microrganismo possui grande número de fatores de virulência que tornam a espécie capaz de colonizar e persistir na cavidade oral, invadindo tecidos periodontais, destruindo tecido conjuntivo e interferindo na reparação tecidual do hospedeiro (FIVES-TAYLOR et al., 1999; PAJU et al., 2000; KURAMITSU, 2003).

A. actinomycetemcomitans agride os tecidos periodontais através da produção de collagenases, epiteliotoxinas, fatores inibidores de fibroblastos, fatores indutores da reabsorção óssea e de um potente lipopolissacarídeo (REPO et al., 1990; WILSON; HENDERSON, 1995; KOLODRUBETZ et al., 1996; KURITA-OCHIAI; OCHIAI, 1996; CHINWALLA et al., 1998; BRISSETTE; FIVES-TAYLOR, 1999; MORIMOTO et al., 1999; MURO et al., 1999).

Para evadir das defesas do hospedeiro, o microrganismo utiliza vários mecanismos como inibição da quimiotaxia, resistência a opsonização, resistência às defensinas, produção de catalase, resistência à lisozima e à elastase, produção de proteínas ligantes à porção Fc de

IgG, à monócitos, à células T e B, além de proteases que degradam imunoglobulinas (ZAMBON, 1985; WILSON; HENDERSON, 1995; FIVES-TAYLOR et al., 1996; MEYER; FIVES-TAYLOR, 1997; OHGUCHI et al., 1998; ZADEH et al., 1999).

Além disso, são conhecidos outros mecanismos de imunossupressão promovidos pela bactéria, como o fator supressor de linfócitos, o fator apoptótico para macrófagos, o fator de inibição da síntese de IL-2, IL-4, IL-5 e TFN- γ por células T e o fator inibidor da produção de peróxido de hidrogênio por polimorfonucleares (CHEN et al., 1991; SHENKER et al., 1995; FIVES-TAYLOR et al., 1999; ZADEH et al., 1999).

O microrganismo produz uma leucotoxina, codificada a partir de um *operon* de quatro genes (*ltxC*, *ltxA*, *ltxB* e *ltxD*), que pertence à família das citolisinas bacterianas RTX (*repeats-in-toxin*), leva à lise leucócitos polimorfonucleares e macrófagos humanos (IWASE et al., 1992), e é considerado o principal fator de virulência de *A. actinomycetemcomitans* (WELCH, 1991).

Células intactas de *A. actinomycetemcomitans* são leucotóxicas e a citotoxicidade da célula se relaciona ao nível de polipeptídeo leucotóxico expresso (BROGAN et al., 1994). A produção da leucotoxina varia entre diferentes cepas, sob diferentes condições de cultura e, um mecanismo cAMP-dependente, possivelmente um sistema de repressão catabólica, parece estar envolvido na sua regulação (INOUE et al., 2001). Amostras associadas a uma alta produção da leucotoxina apresentam uma deleção de cerca de 530 pb na região promotora do *operon ltx* e estão associadas a pacientes com formas agressivas de periodontite (BUENO et al., 1998; CONTRERAS et al., 2000; HARASZTHY et al., 2000; HAUBEK et al., 2001).

A. actinomycetemcomitans também produz uma toxina distensora citoletal (CDT) (MAYER et al., 1999) que é considerada um fator de imunorregulação (SHENKER et al., 2001) e provoca bloqueio do ciclo celular (principalmente na fase G2) de maneira semelhante a injúrias no sistema de checagem de danos ao DNA. Em algumas linhagens celulares, a CDT provoca mudanças no citoesqueleto das células alvo, induzindo ao acúmulo de fibras de F-actina (CORTES-BRATTI et al., 1999). Existem evidências da ligação entre a presença de CDT e a maior capacidade de invasão bacteriana no sangue, baço e fígado, a quadros de encefalopatia hipotensiva, a secreção de IL-8 por células epiteliais intestinais e a quadros de diarreia (ANDERSON et al., 1987; PURDY et al., 2000; CLARKE, 2001).

Vários tipos celulares respondem a presença da CDT e a inibição da renovação epitelial e fibroblástica poderia prolongar a colonização bacteriana dos tecidos periodontais e até alterar o padrão de colonização devido a alteração profunda ocorrida nas células. A inibição da ativação local de linfócitos contribuiria para a falta de resistência à invasão

bacteriana, perpetuando os quadros de infecção periodontal (OHGUCHI et al., 1998; SUGAI et al., 1998; CORTES-BRATTI et al., 1999; MAYER et al., 1999; SHENKER et al., 1999). Além disso, a atividade inibitória sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos permitiria a persistência da infecção bacteriana (ANDO, 2007 - comunicação pessoal¹; FERNANDES et al., 2007).

Próximo à região do gene *cdt* em *A. actinomycetemcomitans* encontra-se o gene *vppA* associado à produção de proteína virulenta em outras espécies de microrganismos (MAYER et al., 1999).

A capacidade de adesão aos tecidos do hospedeiro é considerada um pré-requisito importante para a colonização e manifestação da virulência bacteriana. Para *A. actinomycetemcomitans* a adesão às células epiteliais e às superfícies dentais, além da agregação a outras bactérias orais e sua capacidade de invadir tecidos gengivais, são provavelmente passos iniciais e essenciais na patogênese das periodontites (MEYER; FIVES-TAYLOR, 1994).

Os mecanismos de aderência e invasão de *A. actinomycetemcomitans* em células epiteliais, que envolvem interações específicas e não específicas com a participação de vários fatores, bem como os reguladores destes processos ainda não estão totalmente elucidados (LI et al., 2004; MEYER; FIVES-TAYLOR, 1995).

Em amostras recém isoladas, *A. actinomycetemcomitans* apresenta fimbrias que são perdidas após sucessivos repiques (ROSAN et al., 1988). As subunidades fimbriais do microrganismo são codificadas pelo gene *flp* (KACHLANY et al., 2001). As variantes lisas da espécie possuem propriedades adesivas, indicando a presença de adesinas funcionais e não fimbriais no microrganismo (INOUE et al., 1990).

Entre as adesinas não fimbriais de *A. actinomycetemcomitans*, destaca-se a proteína Aae que possui secreção tipo V. Uma amostra mutante *knock out* desta proteína apresentou redução de até 50% na adesão às células epiteliais KB quando comparada à cepa selvagem (ROSE et al., 2003). A adesina Aae media a adesão às células epiteliais de primatas antigos e humanos, porém o mesmo não é observado em células de primatas novos e na maioria dos mamíferos não-primatas (FINE et al. 2005). A expressão das adesinas Aae e ApiA (também denominada OMP100) intactas induz a ligação de alta especificidade entre *A. actinomycetemcomitans* e células bucais epiteliais (BEC) humanas e de macacos do velho mundo (YUE et al., 2007).

¹ ANDO, ES- São Paulo, 2007 (comunicação pessoal)

A adesão do microrganismo está relacionada com a capacidade de invadir células eucarióticas. A invasão é um processo ativo com alta taxa de síntese protéica já que não há um *pool* pré-formado de proteínas envolvidas no processo (SREENIVASAN et al., 1991). Algumas amostras de *A. actinomycetemcomitans*, como a SUNY465, apresentam alta capacidade invasiva enquanto a maior parte das cepas apresenta capacidade de invasão baixa ou não detectável (MEYER et al., 1991).

A invasão de células epiteliais por *A. actinomycetemcomitans* é um processo de múltiplos eventos que envolvem a entrada no citoplasma, o escape do vacúolo, a rápida multiplicação e espalhamento intra e intercelular da bactéria (MEYER et al., 1996).

A invasão de células epiteliais pelo microrganismo é mediada por adesinas não fimbriais como ApiB e OMP100 (ASAKAWA et al., 2003; LI et al., 2004) e células não fimbriadas são mais invasivas que os fenótipos fimbriados (MEYER et al., 1996).

A OMP100 é um dos principais antígenos reconhecidos no soro de pacientes com periodontite agressiva. Uma amostra *omp100* deficiente apresentou redução de 60% na capacidade de adesão e invasão quando comparada ao fenótipo selvagem (ASAKAWA et al., 2003).

Esta proteína induz a produção de citocinas (IL-6, IL-8 e TNF α) em células epiteliais de gengiva humana, associadas aos processos inflamatórios e de reabsorção óssea em doenças periodontais. Além disso, OMP100 está associada à resistência ao soro devido à ligação do fator H na superfície celular promovendo a inativação do C3b. Foi mostrado que a atividade bactericida do soro foi 90% maior sobre uma amostra mutante deficiente *omp100* do que sobre a amostra selvagem (ASAKAWA et al., 2003).

Outras proteínas do microrganismo, como ApaH, também já foram relacionadas à invasão em células epiteliais. O gene *apaH* codifica uma diadenosina tetrafosfatase, molécula catalítica de alarmonas, responsável por emitir diversos sinais de stress metabólico à célula (BAXI; VISHWANATHA, 1995).

O gene *apaH* de *A. actinomycetemcomitans* é homólogo aos genes *ialA*, *ygdP* e *invA* associados com a invasão de *Bartonella bacilliformis*, *E. coli* K1, *Salmonella enterica* e *Rickettsia prowazekii* (MITCHELL; MINNICK, 1995; BESSMAN et al., 2001; GAYWEE et al., 2003; ISMAIL et al., 2003). A proteína citoplasmática InvA de *R. prowazekii* é expressa em resposta ao stress causado durante a internalização da bactéria em células do hospedeiro, e facilitaria a sobrevivência do microrganismo durante sua entrada, atuando como tampão no citoplasma da célula invadida (GAYWEE et al., 2003).

Uma amostra de *A. actinomycetemcomitans* deficiente em *apaH* mostrou capacidade invasiva reduzida em células KB (SAARELA et al., 1999). O gene *apaH* do microrganismo codifica uma sequência RGD (Arg-Gli-Asp) que se liga à integrinas receptoras de células epiteliais (RUOSLAHTI; PIERSCHBACHER, 1987; SAARELA et al., 1999). Uma amostra de *E. coli* recombinante contendo o gene *apaH* foi capaz de invadir células KB *in vitro* (PAJU et al., 1998) e a adesão de peptídeos RGD resultou em diminuição da adesão à células eucarióticas, sugerindo também um papel de adesina a esta proteína (SAARELA et al., 1999).

Os genes *orf859* e *vapA* de *A. actinomycetemcomitans* são expressos positivamente após contato com células epiteliais HeLa, sugerindo a sua participação na infecção. A resposta de anticorpos a estas proteínas no soro de pacientes com formas de periodontites demonstrou que estes são expressos *in vivo*. Além disso, foi estabelecida relação entre Orf859 e capacidade de sobrevivência intracelular do microrganismo, e relação entre o gene *vapA*, homólogo a um regulador transcricional, com a interação da bactéria com células epiteliais (CAO et al., 2004).

Um dos principais mecanismos de adesão de bactérias aos tecidos do hospedeiro envolve reações hidrofóbicas (GIBBONS; ETHERDEN, 1983; KOZLOVSKY et al., 1987). Em muitos sistemas biológicos, a hidrofobicidade é determinada pela composição protéica, sendo dependente da quantidade de aminoácidos hidrofóbicos, ou não polares, que o constituem (JANDA; ABBOT, 1993).

A membrana externa é a primeira linha de contato entre as bactérias gram negativas e seu ambiente externo. As proteínas de membrana externa (OMPs) são sintetizadas no citoplasma, translocadas através da membrana interna e provavelmente difundidas através do periplasma antes da sua inserção na membrana externa. Essa passagem pelo periplasma, resulta em diversas mudanças conformacionais permitindo a inserção na membrana externa devido a sua natureza hidrofóbica (MOGENSEN; OTZEN, 2005).

Já foram caracterizadas diversas OMPs de *A. actinomycetemcomitans* e Komatsuzawa et al. (2002) identificaram 06 como principais devido a sua relação com soro de pacientes com periodontite. Mudanças na constituição da membrana externa, provocadas por diferenças na expressão das OMPs poderiam determinar alterações na hidrofobicidade da superfície bacteriana.

Em ensaios de adesão a hidroxiapatita foi demonstrado que as amostras de *A. actinomycetemcomitans* apresentam diferentes receptores de adesão, e que esta capacidade de se manter em superfícies rígidas pode ser vantajosa na manifestação de seu potencial destrutivo (KAGERMEIER; LONDON, 1985).

A capacidade de colonizar superfícies dentais, fazendo parte de comunidades estruturadas em biofilme, é um dos principais atributos de uma bactéria associada às periodontites. As amostras rugosas de *A. actinomycetemcomitans* apresentam maior capacidade de formação de biofilme e tolerância às mudanças de salinidade e pH do meio (HAASE et al., 2006), pois as fimbrias, apesar de não serem essenciais para o crescimento aderido à superfície, aumentam as interações células-superfícies e células-células que estabilizam o biofilme (INOUE et al., 2003).

Em estruturas formadas exclusivamente por esta espécie, as amostras rugosas produzem biofilmes formados por torres de microcolônias ancoradas por uma pequena área de contato, enquanto as amostras lisas produzem uma arquitetura aberta com peso reduzido (HAASE et al., 2006). De acordo com Rhodes et al. (2007) o biofilme formado por amostras lisas é mais simples que o formado por amostras rugosas.

Assim como já foi descrito para *Pseudomonas aeruginosa*, na formação do biofilme por *A. actinomycetemcomitans*, estão envolvidos resíduos de carboidratos expostos na superfície, diferentes daqueles associados às fimbrias, além do DNA localizado na superfície que pode funcionar como importante matriz para construção da arquitetura da estrutura (INOUE et al., 2003).

O crescimento do biofilme de *A. actinomycetemcomitans* é um processo discreto e o destacamento celular desta estrutura envolve a formação de células não agregadas dentro do biofilme. A síntese do polissacarídeo O é necessária para o destacamento celular do biofilme, mas não para a adesão superficial ou formação desta estrutura (KAPLAN et al., 2003).

A. actinomycetemcomitans produz a enzima dispersina B (DspB) que causa destacamento de células superficiais de seu próprio biofilme, sugerindo que a estrutura deste biofilme contém uma matriz polissacarídica estruturalmente relacionada ao polímero contendo hexosamina produzido por diversas espécies de *Staphylococcus* e *E. coli* (KAPLAN et al., 2004).

O microrganismo também participa da formação do biofilme dental por sua capacidade de agregação com outras espécies orais como *Streptococcus gordonii* e *Fusobacterium nucleatum* (FILOCHE et al., 2004).

Quando há aumento do *quorum sensing* bacteriano, as células produzem e liberam para o ambiente externo em níveis basais baixos, uma série de moléculas chamadas de autoindutores. Com o aumento populacional, essas moléculas se acumulam até atingirem um nível que ativa diferentes genes que permitem às bactérias sobreviver num ambiente em mudança (FUQUA; GREENBERG, 1998). Em gram negativas já foram descritas duas classes

de moléculas autoindutoras, AI-1 ou lactonas homoserinas aciladas, e AI-2 que tem sua síntese dependente do gene *luxS* (FRIAS et al., 2001).

Foi demonstrado que a expressão da leucotoxina em *A. actinomycetemcomitans* é regulada por *quorum sensing* através do produto do gene *luxS*. Uma maior densidade populacional induz a expressão do *operon lkt*, além disso, a sinalização *luxS*-dependente modula a obtenção de ferro do ambiente pelo microrganismo e induz respostas em outros organismos periodontais em biofilmes orais (FONG et al., 2001).

Em muitos organismos, entre os genes que atuam como reguladores globais da expressão, encontra-se o gene *dam* (DNA-adenina-metiltransferase), associado a modificações do DNA. Campellone et al. (2007) mostraram que uma amostra de *E. coli* enterohemorrágica *dam*⁻ deficiente, apresentou elevados níveis de adesão e formação do pedestal em células epiteliais intestinais, além de altos níveis da proteína intimina. Os resultados mostram que a metilação de Dam pode indiretamente controlar a expressão protéica por mecanismos pós-transcricionais.

Eberhard et al. (2001) clonaram e sequenciaram pela primeira vez o gene metiltransferase em *A. actinomycetemcomitans* e Lippmann et al. (2002) mostraram que uma mutação no gene *dam* está associada à perda da capacidade invasiva do microrganismo em células epiteliais.

Kokeguchi et al. (2000) isolaram e caracterizaram o gene *actX* de *A. actinomycetemcomitans* pertencente à família de genes regulatórios. Este é um gene homólogo ao *fnr-like* de *E. coli* e regula a expressão de genes associados ao crescimento e virulência de *A. actinomycetemcomitans* sob condições anaeróbicas. Na região a montante do gene regulatório *actX*, foram identificados os genes *afnA* e *afnB* (HIROSUE et al., 2001). Foi mostrado que condições anaeróbicas regularam o acúmulo de mRNA de *afnA* e *afnB* sugerindo que o *operon afnA/afnB/actX* é regulado pela presença de oxigênio e que as proteínas semelhantes a ferritina têm importante papel na adaptação de *A. actinomycetemcomitans* às mudanças oxidativas ambientais.

O sistema ArcAB integra um conjunto de sistemas de transdução de sinais de dois componentes. Tais sistemas são mais prevalentes em procariontes, mas também podem ser encontrados em plantas e fungos. Além disso, são altamente conservados na natureza e mediam adaptações a uma variedade de mudanças ambientais. Em *E. coli* o sistema ArcAB controla mais de 30 *operons* em resposta às condições redox de crescimento e do ambiente (GEORGELLIS et al., 2001).

O sistema de sinalização de dois componentes Arc (*anoxic redox control*) é composto por uma quinase sensora (ArcB) encontrada na membrana, e pelo regulador citoplasmático de resposta *OmpR-like* (ArcA) que modula a transcrição de numerosos *operons* (GEORGELLIS et al., 1998). OmpR é uma extensa subfamília dos reguladores de resposta que possuem apenas em *E. coli* 14 homólogos (MIZUNO, 1997).

Proteínas com alta homologia à proteína ArcB de *E. coli* foram observadas em muitos organismos como *Salmonella typhi*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Pasteurella multocida* e *Haemophilus influenzae* (MANUKHOV et al., 2000; GEORGELLIS et al., 2001).

A recepção do sinal pela quinase sensora ArcB estimula a autofosforilação dependente de ATP de um resíduo conservado de histidina no domínio transmissor no citosol. Em seguida, o grupo fosfato é transferido para um resíduo aspartato no domínio receptor do regulador da resposta. Este mecanismo é referido como “sistema *multistep* de fosfotransferência His para Asp” (GEORGELLIS et al., 1998).

A proteína ArcA quando fosforilada (ArcA-P) serve como regulador da transcrição. Quando cessa o sinal, o regulador de resposta e a quinase sensora sofrem desfosforilação que resulta em parada do sistema (GEORGELLIS et al., 1999).

Os reguladores *OmpR-like*, entre eles ArcA, são reguladores de resposta que aumentam a transcrição feita pela RNA-polimerase. O domínio N-terminal recebe a informação da proteína sensora via fosforilação e, a atividade ligante do DNA na terminação carboxila é alterada. As proteínas OmpR são muito conservadas, porém, recebem sinais de proteínas sensoras específicas e reconhecem seqüências específicas de DNA (ITOU; TANAKA, 2001).

O fluxo de informação entre os domínios parece ser bidirecional, isto é, perturbações no domínio regulatório podem influenciar a atividade do domínio efetor e vice-versa (KENNEY et al., 1995).

Peña-Sandoval et al. (2005) mostraram que os domínios receptores e de fosfotransferência da sensora quinase ArcB são necessários e suficientes para uma eficiente desfosforilação da ArcA-fosforilada *in vivo*.

As proteínas da família OmpR regulam diversos sistemas em bactérias e sua importância pode ser observada na regulação de proteínas do choque ácido (AUDIA et al., 2001), na transcrição de genes que codificam proteínas de membrana externa (AIBA et al., 1989), nos mecanismos de regulação de fatores relacionados à evasão das defesas do hospedeiro (PROHINAR et al., 2002), na formação do biofilme (PRINGENT-COMBARET et al., 2001) e na regulação de genes que codificam fimbrias (SCHWAN et al., 2002).

ArcB é uma proteína da subclasse dos sensores que tem um domínio transmissor na região N-terminal e um domínio receptor na região C-terminal. Em geral, uma His-quinase típica tem seqüências que ultrapassam a dupla membrana e se estendem da membrana citoplasmática ao espaço periplasmático, porém ArcB diferentemente das outras quinases sensoras, possui uma seqüência periplasmática pequena (16 aminoácidos). A proteína contém três domínios sinalizadores de fosforilação na região C-terminal: transmissor (His-quinase), receptor e um fosforilador contendo histidina (HPt). O domínio HPt é um sistema comum de transmissão de sinais em vários sistemas de sinalização por fosforilação (MATSUSHIKA; MIZUNO, 1998; KWON et al., 2000).

A porção N-terminal de ArcB é referida como o “domínio de recepção de sinal” e é dividida em três subdomínios putativos: um domínio transmembrana, um domínio “leucina-zipper” e um domínio PAS. O domínio transmembrana serve para ancorar a proteína na superfície interna da membrana citoplasmática. O domínio PAS foi identificado em uma grande família de proteínas de procariotos envolvidas com a percepção de luz, oxigênio, condições redox e outros sinais do ambiente (MATSUSHIKA; MIZUNO, 2000).

Em *E. coli* mutantes com deleção em todo o domínio PAS (*ArcB-ΔPAS*) um fenótipo nulo é observado, isto é, a deleção altera a proteína de maneira que ela não responde mais ao estímulo anóxico *in vivo* (MATSUSHIKA; MIZUNO, 2000). No entanto, a proteína ArcB de *H. influenzae* (e também a seqüência deduzida da proteína em *A. actinomycetemcomitans*) não apresenta o domínio PAS presente em ArcB de *E. coli*. Porém, apesar dessa ausência, a proteína ArcB de *H. influenzae* é funcional e media a sinalização da transdução em resposta às condições redox do ambiente (GEORGELLIS et al., 2001), indicando que o sistema também seria funcional em *A. actinomycetemcomitans*.

Este sistema ArcAB em *E. coli* permite que as células respondam a várias condições respiratórias de crescimento através da regulação da expressão de um grupo de *operons* envolvidos no metabolismo aeróbio (MATSUSHIKA; MIZUNO, 2000). Em resposta a baixos níveis de oxigênio, ArcB é auto fosforilada e fosforila ArcA que age como regulador de transcrição de genes necessários para manter o crescimento anaeróbio (LEE et al., 2001).

Muitos genes regulados pelo sistema ArcAB foram detectados por possuírem na região promotora seqüências denominadas ArcA box que se ligam a ArcA fosforilada. Porém, nem todos os genes que possuem ArcA box estão relacionados ao metabolismo aeróbio de *E. coli* (McGUIRE et al., 2000).

Em *E. coli* os domínios histidina-fosfo-transfer (HPt), como observados em ArcAB, interagem com mais de um domínio regulador de resposta. Assim, ArcA pode exercer sua

função mesmo em um estado não-fosforilado ou na ausência de ArcB quando é fosforilada por outra histidina quinase sensora (MIKA; HENGGE, 2005).

A atividade do sistema ArcAB em *E. coli* parece integrar informações sobre suprimento de oxigênio e de energia e em condições laboratoriais padronizadas de crescimento moderadamente aeróbio, a transição do excesso de carbono e energia para a carência provavelmente é decisivo para a atividade de ArcB (MIKA; HENGGE, 2005).

O fator geral de stress σ^S (RpoS) é controlado em nível transcricional, translacional e proteolítico. O fator aumenta rapidamente e compete com a subunidade σ vegetativa de σ^{70} e induz a respostas gerais ao stress (HENGGE-ARONIS, 2002) que afetam a expressão de aproximadamente 10% dos genes de *E. coli* (WEBER et al., 2005).

Em *E. coli*, ArcB age como um doador de fósforo direto para ArcA, mas também para o regulador de resposta “órfão” RssB que quando fosforilado se liga a σ^S , e age como um fator de reconhecimento proteolítico ou de ligação para σ^S . O acúmulo de fator σ^S em células que estão entrando em carência provavelmente é controlado pela interferência de quinonas oxidadas com autofosforilação de ArcB e conseqüente fosforilação de RssB e ArcA, o que resulta na redução da proteólise de σ^S e na repressão transcricional de *rpoS*. Durante a transição gradual para a fase estacionária, uma mutação em *arcB* produz efeito reduzido na proteólise de σ^S e o fator acumulado durante a entrada na fase estacionária, estimula a expressão de ArcA (MIKA, HENGGE, 2005; YAMAMOTO et al., 2005).

Perrenoud; Sauer (2005) afirmam que embora se saiba que a regulação transcricional possua papel chave no estabelecimento das conexões metabólicas, a extensão do que realmente é controlado *in vivo* dos fluxos metabólicos é desconhecido. Os autores analisaram a relação entre ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, e Mlc para o catabolismo aeróbico da glicose em culturas de *E. coli*. As mutantes *knock outs* ArcB, Cra, Fnr, e Mlc demonstram que a regulação transcricional dependente de ArcA controla direta ou indiretamente o fluxo cíclico de TCA (ácido tricarboxílico) em culturas aeróbicas e anaeróbicas.

O efeito dos reguladores globais ArcA e Fnr na expressão de genes relacionados à regulação de oxigênio e a via metabólica da glicose em *E. coli* sob condições de microaerofilia foi demonstrado por RT-PCR (SHALEL-LEVANON et al., 2005). A proteína Fnr contém um *cluster* FE-S, que age como um sensor redox somente durante o crescimento anaeróbico maximizando a capacidade de geração energética sob esta condição atmosférica. Os resultados indicam que uma menor conversão do piruvato a acetil-CoA é a principal razão

dos altos fluxos de lactato desidrogenase (LDH) observados em culturas de cepas duplo mutantes *arcA/fnr*.

Vários fatores de virulência são regulados pelo potencial redox, como a capacidade de invasão em *Salmonella* ou a síntese de proteína M em *Streptococcus* (GUINEY, 1997). O gene *trx*, que codifica a tireodoxina, uma proteína universal do stress, foi seqüenciado em *A. actinomycetemcomitans* e como em outros organismos, foi associado à adequação da célula ao potencial redox do ambiente (HENDERSON et al., 2001).

Fong et al. (2003) construíram uma amostra *arcB* deficiente de *A. actinomycetemcomitans* que se mostrou incapaz de crescer sob condições aeróbicas com limitação de ferro, e apresentou expressão reduzida dos genes *afuA* e *ftnAB* que codificam uma proteína periplasmática de transporte de ferro e ferritina, indicando que *arcB* pode atuar como regulador da adaptação e crescimento do microrganismo em condições com limitação de ferro.

Apesar de muitos estudos fenotípicos e genotípicos sobre os fatores de virulência de *A. actinomycetemcomitans*, pouco se sabe sobre os reguladores desses fatores e de reguladores de respostas a stress ambientais do microrganismo. A capacidade de gerar mutantes em tais reguladores é uma ferramenta importante na análise da expressão de diversos fatores, inclusive os relacionados à virulência, pois permite a comparação comportamental entre amostras mutantes e selvagens frente a diversas condições ambientais.

A diversidade das condições ambientais a que *A. actinomycetemcomitans* está sujeito (variações de pH, níveis de oxigênio, diferentes fases de crescimento e oferta de nutrientes) poderia afetar a expressão de seus fatores de virulência. As condições ecológicas para que o microrganismo colonize a cavidade oral, tanto na forma de biofilme supra e sub gengival, sugerem a necessidade da regulação de genes que só seriam expressos em condições de anaerobiose ou de escassez de nutrientes.

Em *A. actinomycetemcomitans* não se conhece os genes regulados pelo sistema ArcAB, assim, este trabalho propõem a construção de uma amostra de *A. actinomycetemcomitans* deficiente em *arcB* e a análise da expressão gênica e características fenotípicas ligadas à virulência do microrganismo.

6 CONCLUSÕES

Baseados na metodologia empregada no presente estudo, os resultados sugerem que em *A. actinomycetemcomitans*, ArcB está associado à regulação de fatores de virulência da bactéria.

Especificamente, quando cultivadas em meio enriquecido sob atmosfera de microaerofilia e de anaerobiose, as amostras de *A. actinomycetemcomitans* selvagem e *arcB* deficiente apresentaram:

- desenvolvimento semelhante, indicando ausência de associação entre ArcB e a taxa de crescimento;
- diferenças na capacidade de adesão e de invasão em células KB;
- diferenças na hidrofobicidade celular;
- diferenças na capacidade de formar biofilme;
- diferenças na capacidade de aderir à hidroxiapatita recoberta por saliva;
- diferenças na expressão relativa dos genes *omp29*, *apaH*, *cdtB* e *vppA*, sugerindo que ArcB está envolvido, direta ou indiretamente, na regulação da transcrição destes genes.

REFERÊNCIAS *

AIBA, H.; NAKASAI, F.; MIZUSHIMA, S.; MIZUNO T. Evidence for the physiological importance of the phosphotransfer between the two regulatory components, EnvZ and OmpR, in osmoregulation of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p.14090-14094, 1989.

ALEXEEVA S.; HELLINGWERF K.J.; MATTOS M.J.T. Requirement of ArcA for redox regulation in *Escherichia coli* under microaerobic but not anaerobic or aerobic conditions. **J. Bacteriol.**, v.185, p. 204-209, 2003.

ANDERSON, J.D.; MACNAB, A.J.; GRANSDEN, W.R.; DAMM, S.M.; JOHNSON, W.M.; LIOR, H. Gastroenteritis and encephalopathy associated with a strain of *Escherichia coli* 055:K59:H4 that produced a cytolethal distending toxin. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 6, p. 1135-1136, 1987.

ARMITAGE, G.C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Ann. Periodontol.**, v. 4, p. 1- 6, 1999.

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

ASIKAINEM, S.; LAI, C.H.; ALALUUSUA, S.; SLOTS, J. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and diseases. **Oral Microbiol. Immun.**, v. 6, p. 115-118, 1991.

AUDIA, J.P.; WEBB, C.C.; FOSTER, J.W. Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 291, p. 97-106, 2001.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. (Ed.). **Short Protocols in Molecular Biology**. Wiley John & Sons Inc., 1999. p. 2-12.

BAXI, M.D.; VISHWANATHA, J.K. Diadenosine polyphosphates: their biological and pharmacological significance. **J. Pharmacol. Toxicol. Meth.**, v. 33, p. 121- 128, 1995.

BESSMAN, M.J.; WALSH, J.D.; DUNN, C.A.; SWAMINATHAN, J.; WELDON, J.E.; SHEN, J. The gene *ygdP*, associated with the invasiveness of *Escherichia coli* K1, designates

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

a Nudix hydrolase, Orf176, active on adenosine (5′)-pentaphospho-(5′)-adenosine (Ap5A). **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 37834-37838, 2001

BRADSHAW, D.J.; MARSH, P.D.; ALLISON, C.; SCHILLING, K.M. Effecto of oxygen, inoculum composition and flow rate on development of mixed-culture oral biofilms. **Microbiology**, v. 142, p. 623-629, 1996.

BRISSETTE, C.A.; FIVES-TAYLOR, P.M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* may utilize either actin-dependent or actin-independet mechanisms of invasion. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 14, p. 137-142, 1999.

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

BUENO, L.C.; MAYER, M.P.A.; DIRIENZO, J.M. Relationship between conversion of localized juvenile periodontitis susceptible children from health to disease ans *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin promoter structure. **J. Periodontol.**, v. 69, p. 998-10007, 1998.

CAMPELLONE, K.G.; ROE, A.J.; LOBNER-OLESEN, A.; MURPHY, K.C.; MAGOUN, L.; BRADY, M.J.; DONOHUE-ROLFE, A.; TZIPORI, S.; GALLY, D.L.; LEONG, J.M.; MARINUS, M.G. Increased adherence abd actin pedestal formation by *dam*-deficient enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Mol. Microbiol.**, v. 63, p. 1468-1481, 2007.

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

CHANANA, V.; MAJUMDAR, S.; RAY, P.; SHARMA, M.; RISHI, P. Coordinated expression and immunogenicity of an outer membrane protein from *Salmonella enterica* serovar *Typhi* under iron limitation, oxidative stress and anaerobic conditions. **J. Biomed. Sci.**, v.13, p. 303-312, 2006.

CHEN, P.B.; DAVERN, L.B.; NEIDERS, M.E.; REYNOLDS, H.S.; ZAMBON, J.J. Analysis of *in vitro* lymphoproliferative responses and antibody formation following tha subcutaneous injection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Wolinella recta* in a murine model. **Oral Microbiol. Immun.**, v. 6, p.12-16, 1991.

CHINWALLA, J.; TOSI, M.; BISSADA, N.F. Severity of localized juvenile periodontitis as related to polymorphonuclear chemotaxis and specific microbial isolates. **Periodont. Clin. Investig.**, v. 20, p. 6-11, 1998.

CLARKE, S.C. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* – an emerging problem? **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 41, p. 93-98, 2001.

CONTRERAS, S.A.; RUSITANONTA, T.; CHEN, C.; WAGNER, W.G.; MICHALOWICZ, B.S.; SLOTS, J. Frequency of 530-bp deletion in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin promoter region. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 15, p. 338-340, 2000.

CORTES-BRATTI, X.; CHAVES-OLARTE, E.; LAGERGARD, T.; THELESTAM, M. The cytolethal distending toxin from the chancroid bacterium *Haemophilus ducreyi* induces cell-cycle arrest in the G2 phase. **J. Clin. Invest.**, v. 103, p.107-115, 1999.

DAVEY, M.E.; COSTERTON, J.W. Molecular genetics analyses of biofilm formation in oral isolates. **Periodontology** 2000, v. 42, p. 13-26, 2006.

DAVIES, D.G.; PARSEK, M.R.; PEARSON, J.P.; IGLEWSKI, B.H.; COSTERTON, J.W.; GREENBERG E.P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, p. 295-298, 1998.

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

FERNANDES, K.P.S.; MAYER, M.P.A.; ANDO, E.S.; AMARANTE-MENDES, J.G.P.; ULBRICH, A.G.; RUSSO, M. Inhibition of IF-gama- induced NO production in endotoxin activated macrophages by cytolethal distending toxin. **Oral Microbiol. Immunol.**, 2008 *in press*.

EBERHARD, J.; OZA, J.; REICH, N.O. Cloning, sequence analysis and heterologous expression of the DNA adenine- (N⁶) methyltransferase from the human pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 195, p. 223-229, 2001.

FILOCHE, S.R.; ZHU, M.; WU, C.D. *In situ* biofilm formation by multi-species oral bacteria under flowing and anaerobic conditions. **J. Dent Res.**, v. 83, p. 802-806, 2004.

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

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

FIVES-TAYLOR, P.M.; MEYER, D.H.; MINTZ, K.P. Virulence factors of periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Periodontol.**, v. 67, p. 291-297, 1996.

FIVES-TAYLOR, P.M.; MEYER, D.H.; MINTZ, K.P.; BRISSETTE, C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Periodontology**, v. 20, p. 136-167, 1999.

FLETCHER, J.M.; NAIR, S.P.; WARD, J.M.; HENDERSON, B.; WILSON, M. Analysis of the effect of changing environmental conditions on the expression patterns of exported surface-associated proteins of the oral pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Microb. Pathog.**, v. 30, p. 359-368, 2001.

FONG, K.P.; CHUNG, W.O.; LAMONT, R.J.; DEMUTH, D.R. Intra-and interspecies regulation of gene expression by *Actinobacillus actinomycetemcomitans luxS*. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 7625-7634, 2001.

FONG, K.P.; GAO, L.; DEMUTH, D.R. *luxS* and *arcB* control aerobic growth of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* under iron limitation. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 298-308, 2003.

FRIAS, J.; OLLE, E.; ALSINA, M. Periodontal pathogens produce quorum sensing signal molecules. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 3431-3434, 2001.

FUQUA, C.; GREENBERG, E.P. Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 1, p. 183-199, 1998.

GAYWEE, J.; XU, W.; RADULOVIC, S.; BESSMAN, M.J.; AZAD, A.F. The *Rickettsia prowazekii* invasion gene homolog (*invA*) encodes a Nudix hydrolase active on adenosine (5')-pentaphospho-(5')- adenosine. **Mol. Cell Proteom.**, v. 3, p. 179-185, 2002.

GEORGELLIS, D.; KWON, O.; DeWULF P.; LIN, E.C. Signal decay through a reverse phosphorelay in the Arc two-component signal transduction system. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 32864-32869, 1998.

GEORGELLIS, D.; KWON, O.; LIN, E.C. Amplification of signaling activity of the arc two-component system of *Escherichia coli* by anaerobic metabolites- an *in vitro* study with different protein modules. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 35950-35954, 1999.

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

GIBBONS, R.J.; ETHERDEN, I. Comparative hydrophobicities of oral bacteria and their adherence to salivary pellicles. **Infect. Immun.**, v. 41, p. 1190-1196, 1983.

GUINEY, D.G. Regulation of bacterial virulence gene expression by the host environment. **J. Clin. Invest.**, v. 99, p. 565-569, 1997.

HAASE, E.M.; BONSTEIN, T.; PALMER, R.J.Jr.; SACNNAPIECO, F.A. Environmental influences on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm formation. **Arch. Oral Biol.**, v. 51, p. 299-314, 2006.

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 leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 71, p. 912-922, 2000.

HAUBEK, D.; POULSEN, K.; WESTERGAARD, J.; DÁHLEN, G.; KILIAN, M. Highly toxin clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in geographically widespread cases of juvenile periodontitis in adolescents of African origin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 1576-1578, 1996.

HAUBEK, D.; DIRIENZO, J.M.; TINOCO, E.M.; WETERGAARD, J.; LÓPEZ, N.J.; CHUNG, C.P.; POULSEN, K.; KILIAN, M. Racial tropism of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated with juvenile periodontitis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 3037-3042, 1997.

HAUBEK, D.; ENNIBI, O.K.; POULSEN, S.; BENZARTI, N.; KILIAN, M. Early-onset periodontitis in Morocco is associated with the highly leucotoxin clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Dent. Res.**, v. 80, p. 1580-1583, 2001.

HENDERSON, B.; TABONA, P.; POOLE, S.; NAIR, S.P. Cloning and expression of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* thioredoxin (*trx*) gene and assessment of cytokine inhibitory activity. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 154-158, 2001.

HENGGE-ARONIS, R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. **Microbiol. Molec. Biol. Rev.**, v. 66, p. 373-395, 2002,

HIROSUE, M.; KOKEGUCHI, S.; MAEDA, H.; NISHIMURA, F.; TAKASHIBA, S.; MURAYAMA, Y. Characterization of two genes encoding ferritin-like protein in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Microbiol. Immun.**, v. 45, p. 721-727, 2001.

HOLM, A.; KALFAS, S. Cell surface hydrophobicity and eletrokinetic potential in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 6, p. 236-240, 1991.

INOUE, T.; OHTA, H.; KOKEGUCHI, S.; FUKUI, K.; KATO, K. Colonial variation and fimbriation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 69, p. 13-17, 1990.

INOUE, T.; TANIMOTO, I.; TADA, T.; OHASHI, T.; FUKUI, K.; OHTA, H. Fermentable-sugar-level-dependent regulation of leukotoxin synthesis in a variably toxic strain of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Microbiology**, v. 147, p. 2749-2756, 2001.

INOUE, T.; SHINGAKI, R.; SOGAWA, N.; SOGAWA, C.A.; ASAUMI, J.; KOKEGUCHI, S.; FUKUI, K. Biofilm formation by a fimbriae-deficient of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Microbiol. Immunol.**, v. 47, p. 877-881, 2003.

ISMAIL, T.M.; HART, C.A.; McLENNAN, A.G. Regulation of dinucleoside polyphosphate pools by the YgdP and ApaH hydrolases is essential for the ability of *Salmonella enterica* serovar typhimurium to invade cultured mammalian cells. **J. Biol. Chem.**, v. 29, p. 32602-32607, 2003.

ITOU, H.; TANAKA, I. The OmpR-family of proteins: insight into the tertiary structure and functions of two-component regulator proteins. **J. Biochem.**, v. 129, p. 343-350, 2001.

IUCHI, S.; WEINER, L. Cellular and molecular physiology of *Escherichia coli* in the adaptation to aerobic environments. **J. Biochem.**, v. 120, p. 1055-1063, 1996.

IZANO, E.A.; WANG, H.; RAGUNATH, C.; RAMASSUBBU, N.; KAPLAN, J.B. Detachment and killing of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilms by dispersin B and SDS. **J. Dent. Res.**, v. 86, p. 618-622, 2007.

IWASE, M.; KORCHAK, H.M.; LALLY, E.T.; BERTHOLD, P.; TAICHMAN, N.S. Lytic effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human neutrophil cytoplasts. **J. Leukoc. Biol.**, v. 52, p. 224-227, 1992.

JANDA, M.J.; ABBOT, S.L. Microbiological hydrophobicity- the sticky end of things. **Clin. Microbiol. Newslett.**, v. 15, p. 9-12, 1993.

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

KAGERMEIER, A.S.; LONDON, J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains Y4 and N27 adhere to hydroxyapatite by distinctive mechanisms. **Infect. Immun.**, v. 47, p. 654-658, 1985.

KAPLAN, J.B.; FINE, D.H. Codon usage in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 163, p. 31-36, 1998.

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

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

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

KAWAI, T.; PASTER, B.J.; KOMATSUZAWA, H.; ERNST, C.W.; GONÇALVES, R.B.; SASAKI, K.; OUHARA, K.; STASHENKO, P.P.; SUGAI, M.; TAUBMAN, MA. Cross-reactive adaptive immune response to oral commensal bacteria results in an induction of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL)-dependent periodontal bone resorption in a mouse model. **Oral microbial. Immunol.**, v. 22, p. 208-215, 2007.

KENNEY, L.J.; BAUER, M.D.; SILHARY, T.J. Phosphorylation-dependent conformational changes in OmpR, an osmoregulatory DNA-binding protein of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 8866-8870, 1995.

KOKEGUCHI, S.; HIROSUE, M.; MAEDA, H.; MIYAMOTO, M.; TAKASHIBA, S.; MURAYAMA, Y. Molecular characterization of the *hlyX-like* gene of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4. **Res. Microbiol.**, v. 151, p. 721-725, 2000.

KOLODRUBETZ, D.; SPITZNAGEL, J.Jr.; WANG, B.; PHILLIPS, L.H.; JACOBS, C.; KRAIG, E. Cis elements and trans factors are both important in strain-specific regulation of the leukotoxin gene in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 3451-3460, 1996.

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, p. 195-201, 2002.

KOZLOVSKY, A.; METZGER, Z.; ELI, I. Cells surface hydrophobicity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4. **J. Clin. Periodontol.**, v. 14, p. 370-372, 1987.

KURAMITSU, H.K. Molecular genetic analysis of the virulence of oral bacterial pathogens: an historical perspective. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 14, p. 331-344, 2003.

KURITA-OCHIAI, T.; OCHIAI, K. Immunosuppressive factor from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* down regulates cytokine production. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 50-54, 1996.

KWON, O.; GEORGELLIS, D.; LYNCH, A.S.; BOYD, D.; LIN, E.C. The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: Genetic exploration of the transmembrane region. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 2960-2966, 2000.

KYTE, J. The basis of the hydrophobic effect. **Biophys. Chem.**, v. 100, p. 193-203, 2003.

LANG, N.K.; BARTOLD, P.M.; CULLIAN, M.; JEFFCOAT, M.; MOMBELLI, A.; PAGE, R.; PAPAPANOU, P.; TONETTI, M.; VanDIKE, T. Consensus reports: aggressive periodontitis. **Ann. Periodontol.**, v. 4, p. 53, 1999.

LEE, Y.S.; HANS, J.S.; JEON, Y.; HUANG, D.S. The arc two-component signal transduction system inhibits *in vitro* *Escherichia coli* chromosomal initiation. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 9917-9923, 2001.

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

LIPPMANN, J.E.; WU, H.; FIVES-TAYLOR, P.M. Directed mutagenesis of the DNA-Adenine-Methyltransferase (DAM) gene in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa) by conjugation. **J. Dent Res.**, Special Issue, Abst 1002, 2002.

MANUKHOV, I.V.; BERTSOVA, Y.V.; TROFIMOV, D.Y.; BOGACHEV, A.V.; SKULACHEV, V.P. Analysis of HI0220 protein from *Haemophilus influenzae*, a novel structural and functional analog of ArcB protein from *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 65, p. 1321-1326, 2000.

MATSUSHIKA, A.; MIZUNO, T. The structure and function of the histidine-containing phosphotransfer (HPT) signaling domain of the *Escherichia coli* ArcB sensor. **J. Biochem.**, v. 124, p. 440-445, 1998.

MATSUSHIKA, A.; MIZUNO, T. Characterization of three putative sub-domains in the signal-input domain of the ArcB hybrid sensor in *Escherichia coli*. **J. Biochem.**, v. 127, p. 855-860, 2000.

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

McGUIRE, A.M.; HUGHES, J.D.; CHURCH, G.M. Conservation of DNA regulatory motifs and discovery of new motifs in microbial genomes. **Genomes Res.**, v. 10, p. 744-757, 2000.

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

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

MEYER, D.H.; FIVES-TAYLOR, P.M. Adhesion of oral bacteria to soft tissue. **Methods Enzymol.**, v. 253, p. 373-385, 1995.

MEYER, D.H.; LIPPMANN, J.E.; FIVES-TAYLOR, P.M. Invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a dynamic, multistep process. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2988-2997, 1996.

MEYER, D.H.; FIVES-TAYLOR, P.M. The role of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of periodontal disease. **Trends Microbiol.**, v. 5, p. 224-228, 1997.

MIKA, F.; HENGGE, R. A two-component phosphotransfer network involving ArcB, ArcA, and RssB coordinates synthesis and proteolysis of δ^S (RpoS) in *E. coli*. **Genes Devel.**, v. 19, p. 2770-2781, 2005.

MINTZ, K.; FIVES-TAYLOR, P. *ImpA*, a gene coding for an inner membrane protein, influences colonial morphology of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 6580-6586, 2000.

MINTZ, K.; BRISSETE, C.; FIVES-TAYLOR, P. A recombinase A-deficient strain of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* constructed by insertional mutagenesis using a mobilizable plasmid. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 26, p. 87-92, 2002.

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

MIZUNO, T. Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. **DNA Res.**, v. 4, p. 161-168, 1997.

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

MORIMOTO, Y.; MORIMOTO, H.; MURATA, T.; KOBAYASHI, S.; OHBA, T.; HANEJI, T. Extracts of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* induce apoptotic cell death in human osteoblastic MG63 cells. **J. Dent. Res.**, v. 78, p. 735-742, 1999.

MURO, M.; NAKASHIMA, K.; TOMIOKA, J.; KATO, S.; NONAKA, K.; YOSHIDA, T.; INOUE, M.; SHIHARA, T.; KOWASHI, Y. Inhibitory effect of lipopolysaccharide cell death in macrophages infected with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 175, p. 211-216, 1999.

NORSKOV-LAURITSEN, N.; KILIAN, M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 56, p. 2135-2146, 2006.

OHGUCHI, M.; ISHISAKI, A.; OKAHASHI, N.; KOIDE, M.; KOSEKI, T.; YAMATO, K.; NOGUCHI, T.; NISHIHARA, T. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* toxin induces both cell cycle arrest in the G2/M phase and apoptosis. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 5980-5987, 1998.

PAJU, S.; SAARELA, M.; ALALUUSUA, S.; FIVES-TAYLOR, P.; ASIKAINEM, S. Characterization of serologically nontypeable *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2019-2022, 1998.

PAJU, S.; CARLSON, P.; JOUSIMIES-SOMER, H.; ASIKAINEM, S. Heterogeneity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in various human infections and relationships between serotype, genotype and antimicrobial susceptibility. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 79-84, 2000.

PEÑA-SANDOVAL, G.R.; KWON, O.; GEORGELLIS, D. Requirement of the receiver and phosphotransfer domains of ArcB for efficient dephosphorylation of phosphorylated ArcA in vivo. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 3267-3272, 2005.

PERES, C.M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005. p. 23.

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

PERRENOUD, A.; SAUER, U. Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr and Mlc on glucose catabolism in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 3171-3179, 2005.

PRINGENT-COMBARET, C.; BROMBACHER, E.; VIDAL, O.; AMBERT, A.; LEJEUNE, P.; LANDINI, P.; DOREL, C. Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 7213-7223, 2001.

PROHINAR, P.; FORST, S.A.; REED, D.; MANDIC-MULEC, I.; WEISS, J. OmpR-dependent and OmpR-independent responses of *Escherichia coli* to sublethal attack by the neutrophil bactericidal/permeability increasing protein. **Mol. Microbiol.** v. 43, p. 1493-1504, 2002.

PURDY, D.; BUSWELL, C.M.; HODGSON, A.E.; McALPINE, K.; HENDERSON, I.; LEACH, S.A. Characterization of cytolethal distending toxin (CDT) mutants of *Campylobacter jejuni*. **J. Med. Microbiol.**, v. 49, p. 473-479, 2000.

REPO, H.; SAXEN, L.; JAATTELA, M.; RISTOLA, M.; LEIRISALO-REPO, M. Phagocyte function in juvenile periodontitis. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 1085-1092, 1990.

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

RHODES, E.R.; SHOEMAKER, C.J.; MENKE, S.M.; EDELMANN, R.E.; ACTIS, L.A. Evaluation of different iron sources and their influence in biofilm formation by the dental pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p. 119-128, 2007.

RODRIGUEZ, C.; KWON, O.; GEORGELLIS, D. Effect of D-lactate on the physiological activity of the ArcB sensor kinase in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 2085-2090, 2004.

ROSAN, B.; SLOTS, J.; LAMONT, R.J.; LISTGARTEN, M.A.; NELSON, G.M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* fimbriae. **Oral Microbiol. Immun.**, v. 3, p. 58-63, 1988.

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

RUOSLAHTI, E.; PIERSCHBACHER, M.D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. **Science**, v. 238, p. 491-497, 1987.

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

SCHWAN, W.R.; LEE, J.L.; LENARD, F.A.; MATTHEWS, B.T.; BECK, M.T. Osmolarity and pH growth conditions regulate *fim* gene transcription and type 1 pilus expression in uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 1391-1402, 2002.

SHAO, H.; LAMONT, R.J.; DEMUTH, D.R. Autoinducer 2 is required of biofilm growth of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. **Infec. Immun.**, v. 75, p. 4211-4218, 2007.

SHALEL-LEVANON, S.; SAN, K.Y.; BENNETTE, G.N. Effect of ArcA and FNR on the expression of genes related to the oxygen regulation and the glycolysis pathway in

Escherichia coli under microaerobic growth conditions. **Biotech. Bioengin.**, v. 20, p. 1-13, 2005.

SHENKER, B.J.; VITALE, L.A.; KING, C. Induction of human T cells that co-express CD4 and CD8 by an immunoregulatory protein produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Cell Immunol.**, v. 164, p. 36-46, 1995.

SHENKER, B.J.; McKAY, T.; DATAR, S.; MILLER, M.; CHOWHAN, R.; DEMUTH, D.R. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* immunosuppressive protein is a member of the family of cytolethal distending toxins capable of causing a G2 arrest in human T cell. **J. Immunol.**, v. 162, p. 4773-4780, 1999.

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

SILVA, R.M.; CAUGANT, D.A.; LINGASS, P.S.; GEIRAN, O.; TRONSTAD, L.; OLSEN, I. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* but not bacteria of the red complex in aortic aneurysm by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 6, p. 399-428, 1990.

SREENIVASAN, P.K.; LeBLAN, D.J.; LEE, L.N.; FIVES-TAYLOR, P. Transformation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by electroporation, utilizing constructed shuttle plasmids. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 4621-4627, 1991.

STOCK, A.M.; ROBINSON, V.L.; GOUDREAU, P.N. Two-component signal transduction. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, p. 183-215, 2000.

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

TAN, K.S.; WOO, C.H.; ONG, G.; SONG, K.P. Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in an ethnic adult Chinese population. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, p. 886-890, 2001.

TINOCO, E.M.; SIVAKUMAR, M.; PRESU, H.K.; The distribution and transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families with localized juvenile periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 25, p. 99-105, 1998.

TOJEIRA-PRESTIA, A.T.; ANDO, E.S.; GENNARO, A.L.; TAUBMAN, M.; KOMATSUZAWA, H.; OUHARA, K.; KAWAI, T.; MAYER, M.P.A. Serum antibody levels to OMP100 and OMP29 of *A. actinomycetemcomitans*. In: 84th General Session & Exhibition

of the IADR, 1985, 2006, Brisbane. **Abstracts**. International Association for Dental Research, 2007.

TONETTI, M.S.; MOBILI, A. Early-onset periodontitis. **Ann. Periodontol.**, v. 4, p. 39- 53, 1999.

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. 29, p. 502-507, 2005.

UMEDA, M.; CHEN, C.; BAKKER, I.; CONTRERAS, A.; MORRISON, J.L.; SLOTS, J. Risk indicators for harboring periodontal pathogens. **J. Periodontol.**, v. 69, p. 1112-1119, 1998.

WEBER, H.; POLEN, T.; HEUVELING, J.; WENDISCH, V.; HENGGE, R. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: σ^S -dependent genes, promotres and σ factor selectivity. **J Bacteriol.**, v. 187, p. 1591-1603, 2005.

WEERKAMP, A.H.; Van der MEI, H.C.; BUSSCHER, H.J. Surface hydrophobicity and surface free energy of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains from human periodontitis. **Microbios.**, v. 63, p. 135-143, 1990.

WELCH, R A. Pore forming cytolysins of gram negative bacteria. **Mol. Microbiol.**, v. 5, p. 521-528, 1991.

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

YAMAMOTO, K.; HIRAO, K.; OSHIMA, T.; AIBA, H.; UTSUMI, R.; ISHIHAMA, A. Functional characterization *in vitro* of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 1448-1456, 2005.

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, p. 28-33, 2005.

YARWOOD, J.M.; BARTELS, D.J.; VOLPER, E.M.; GRINBERG, E.P. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 1838-1850, 2004.

YUE, G.; KAPLAN, J.B.; FURGANG, D.; MANSFIELD, K.G.; FINE, D.H. A second *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* autotransporter adhesin exhibits specificity for

buccal epithelial cells in humans and Old World primates. **Infect. Immunol.**, v. 75, p. 4440-448, 2007.

ZADEH, H.H.; NICHOLS, F.C.; MIYASAKI, K.T. The role of the cell-mediated immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. **Periodontol.** 2000, v. 20, p. 239-248, 1999.

ZAMBON, J.J.; SLOTS, J.; GENCO, R.J. Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. **Infect. Immun.**, v. 41, p. 19-27, 1983.

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

ZAMBON, J.J.; UMEMOTO, T.; De NARDIN, E.; NAKAZAWA, F.; CHRISTERSSON, R.J.; GENCO, R.J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of human periodontal disease. **Adv. Dent. Res.**, v. 2, p. 269-274, 1988.