

**LUCAS RIBEIRO DE SOUSA ALMEIDA**

**Adesina Aae de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: envolvimento na adesão a proteínas da matriz extracelular, polimorfismo genético e resposta imune humoral.**

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

2017

## RESUMO

ALMEIDA, L. R. S. **Adesina Aae de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: envolvimento na adesão a proteínas da matriz extracelular, polimorfismo genético e resposta imune humoral.** 2017. 132 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* está associado à etiologia da periodontite agressiva principalmente na sua forma localizada. O patógeno pertence ao grupo HACEK (*Haemophilus* spp., *Aggregatibacter* spp., *Cardiobacterium* spp., *Eikenella corrodens*, and *Kingella* spp.) - que compreende microorganismos da orofaringe envolvidos em casos de endocardite bacteriana, sendo um dos mais prevalentes dentre os membros deste grupo. Para desenvolver a patogênese é necessária a colonização dos tecidos do hospedeiro e a adesão é uma etapa fundamental deste processo. Entre os fatores de colonização da cavidade oral por esta espécie destaca-se a proteína autotransportada Aae, que promove a ligação da bactéria às células epiteliais gengivais. As proteínas autotransportadas obtidas de diferentes espécies apresentam múltiplas funções e podem ser candidatas a antígenos vacinais na prevenção de infecções causadas pelas bactérias produtoras.

O presente estudo visa contribuir com o conhecimento sobre o papel de Aae de *A. actinomycetemcomitans* na ligação aos tecidos do hospedeiro e o efeito de anticorpos contra esta proteína. O polimorfismo de *aae* na região que codifica o domínio de ligação a células epiteliais foi determinado em diferentes amostras da bactéria, e este relacionado à capacidade de adesão a células epiteliais. Posteriormente Aae recombinante foi obtida, e os títulos de IgG sérica contra Aae em pacientes com periodontite agressiva e com periodonto saudável foram determinados e estes relacionados à resposta humoral contra diferentes sorotipos de *A. actinomycetemcomitans*. Além disso, o efeito de anticorpos policlonais contra esta proteína e/ou seu domínio efetor, obtidos em modelo animal, foi determinado na inibição da adesão da bactéria mediada por Aae, e na opsonização por fagócitos RAW 264.7. Sua capacidade de ligação a outros substratos como proteínas da matriz extracelular e plasma foi avaliada usando Aae<sup>His</sup> recombinante, em ELISA modificado, e uma amostra mutante obtida, deficiente na expressão de Aae, através de ensaios comparativos com a amostra selvagem.

O presente estudo revelou que a adesina Aae de *A. actinomycetemcomitans* não é imunogênica, o que poderia representar uma estratégia de evasão das defesas do hospedeiro. Além disso, nossos dados revelam que Aae é capaz de promover a ligação da bactéria não somente às células epiteliais, mas também a diferentes proteínas da matriz celular e do soro, como plasminogênio, fibrinogênio, fibronectina plasmática, e laminina. Esta característica multifuncional da adesina Aae sugere a sua importância na colonização por *A. actinomycetemcomitans* não apenas da cavidade oral, mas também de sítios extra-orais.

**Palavras-chave:** Proteína de membrana externa. Proteínas autotransportadoras. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Doença periodontal. Proteínas de matriz extracelular.

## ABSTRACT

ALMEIDA, L. R. S. **Aae adhesin of *A. actinomycetemcomitans*: Implication in binding to extracellular matrix proteins, genetic polymorphisms and humoral immune response.** 2017. 132 p. Ph. D. thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is associated with etiology of aggressive periodontitis, mainly in localized form. The pathogen belongs to the HACEK group (*Haemophilus* spp., *Aggregatibacter* spp., *Cardiobacterium* spp., *Eikenella corrodens*, and *Kingella* spp.) – that contains microorganisms from oropharynx involved in bacterial endocarditis, being one of the most prevalent ones among them. Colonization of host tissues is necessary to pathogenesis and adhesion is an essential step. In behalf of colonization tools of oral cavity promoted by this species, the autotransporter protein Aae could be highlighted and it mediates the adhesion of bacteria to gingival epithelial cells. Autotransporter proteins from different species have multiple functions and could be vaccine antigens to prevent infections induced by them.

This research aims to contribute with the understanding of the role of Aae in host tissues interaction and the effect of antibodies against it. Polymorphism of *aae* in codifying effector domain region of ligation to epithelial cells was determined in different samples of the bacteria and related with adhesion to these cells. Later, recombinant Aae was obtained and IgG titers against Aae were determined in patients with aggressive periodontitis and healthy and related to humoral response against *A. actinomycetemcomitans* different serotypes. Following this, the effect of antibodies against Aae and/or its effector domain, obtained in animal model, was determined in inhibition of adhesion of the bacteria mediated by Aae and macrophages RAW 264.7 opsonization. Its ability of interaction with other substrates as extracellular matrix and serum proteins was evaluated using the recombinant Aae<sup>His</sup>, in modified ELISA, and an obtained defective sample in Aae expression through comparative assays with the wild type sample.

The present study revealed that *A. actinomycetemcomitans* adhesin Aae is not immunogenic, which could represent an evasion strategy of host defenses. Besides that, our data reveals that Aae is able to promote the ligation of the bacteria not only to epithelial cells, but also to different proteins of extracellular matrix and serum like

plasminogen, fibrinogen, plasma fibronectin and laminin. This multifunctional feature of adhesion Aae suggests its importance in *A. actinomycetemcomitans* colonization not only in the oral cavity, but also in extra oral sites.

**Keywords:** Outer membrane protein. Autotransporter proteins. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Periodontal disease. Extracellular matrix proteins.

## 1 INTRODUÇÃO

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* está associado à etiologia da periodontite agressiva principalmente na sua forma localizada. O patógeno pertence ao grupo HACEK (*Haemophilus* spp., *Aggregatibacter* spp., *Cardiobacterium* spp., *Eikenella corrodens*, and *Kingella* spp.) - que compreende microorganismos da orofaringe envolvidos em casos de endocardite bacteriana, sendo um dos mais prevalentes dentre os membros deste grupo (CHAMBERS et al. 2013; DAS et al., 1997; TANG et al., 2008). Para desenvolver a patogênese das infecções em que está associado é necessária a colonização dos tecidos do hospedeiro e a adesão é uma etapa fundamental deste processo (FINE et al., 2006). Entre os fatores de colonização da cavidade oral por esta espécie destaca-se a proteína autotransportada Aae, que promove a ligação da bactéria às células epiteliais gengivais. As proteínas autotransportadas obtidas de diferentes espécies apresentam múltiplas funções e podem ser candidatas a antígenos vacinais na prevenção de infecções causadas pelas bactérias produtoras.

A periodontite é um processo inflamatório em resposta a bactérias presentes no biofilme que induz à perda de adesão tecidual, com destruição dos tecidos de suporte que pode levar à perda dental (ZAMBON, 1985). A etiologia da doença é complexa e sua cura é inexistente, embora existam terapias para amenizar sua gravidade (PERSSON, 2005). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, está associado fortemente à periodontite agressiva principalmente na sua forma localizada (PAL) (SLOTS; LISTEGARTEN, 1988; TAKAHASHI et al., 2001; ZAMBON, 1985). Fatores inerentes ao hospedeiro também podem influenciar o estabelecimento e progressão doença (SCHENKEIN, 2007; DIEHL et al., 2003).

Anteriormente classificada no gênero *Actinobacillus*, a espécie passou a integrar o novo gênero *Aggregatibacter*, denominada *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, juntamente com *Aggregatibacter aphrophilus* e *Aggregatibacter segnis*, com base em estudos de homologia de DNA e análise filogenética de genes de manutenção (NØRSKOV-LAURITSEN; KILIAN, 2006).

*A. actinomycetemcomitans* é um microrganismo Gram-negativo, filo *Proteobacteria*, classe *gamaproteobacteria*, membro da família *Pasteurellaceae*, sacarolítico, imóvel, anaeróbio facultativo, classificado em 7 sorotipos (a - g), sendo os sorotipos a, b e c os mais prevalentes entre os isolados clínicos (ASIKAINEN et al.;

1991; KAPLAN et al.; 2002; OLSEN et al.; 1999; SLOTS et al., 1982; TEIXEIRA et al., 2006; ZAMBON et al., 1990) e o sorotipo g relatado recentemente (TAKADA et al., 2010).

Um patógeno periodontal deve apresentar propriedades que permitam a colonização do periodonto, a evasão das defesas do hospedeiro, e a indução de dano tecidual (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1991). Em *A. actinomycetemcomitans* destacam-se fatores de virulência como a produção de duas toxinas, a toxina distensora citoletal - cdt e a leucotoxina – ltx, relacionadas à evasão das defesas do hospedeiro e a destruição dos tecidos (ANDO et al., 2010). Adesão a superfícies mucosas e formação de biofilme são estratégias que *A. actinomycetemcomitans* desenvolveu para se manter na cavidade oral, mediadas pelas adesinas fimbriais e não fimbriais, capazes de interagir e aderir a receptores presentes na superfície dos dentes, a matriz extracelular das proteínas, a células epiteliais e a outras bactérias (ASAKAWA et al., 2003; MEYER; FIVES-TAYLOR, 1994; ROSE et al., 2003). A colonização por *A. actinomycetemcomitans* da cavidade bucal é dependente da sua capacidade de adesão aos tecidos orais ou de agregação a outros microrganismos que compõe o biofilme dental. Fímbria, lipopolissacarídeo (LPS), e substâncias poliméricas extracelulares (EPS) contribuem para formação de biofilme por *A. actinomycetemcomitans* (AMARASINGHE et al., 2009; KIMIZUKA et al., 2009). As amostras recém isoladas (isolados clínicos) de *A. actinomycetemcomitans* formam colônias rugosas em ágar, e exibem maior número de fímbrias e melhor capacidade de adesão a células KB que as amostras que sofreram repiques em laboratório, afimbriadas e que foram colônias lisas em ágar, e produzem material amorfo extracelular mais abundante (ELLEN, 1999).

A adesão a células ou a componentes secretados da mucosa é uma estratégia usada pelos microrganismos para evadir das defesas do hospedeiro e evitar sua eliminação pelo fluxo de secreções das mucosas, como saliva e fluido crevicular. Além disso, estando aderidos os microrganismos apresentam maior capacidade de captação de nutrientes e multiplicação. A especificidade no processo de adesão relaciona-se ao tropismo de um patógeno e o guia ao sítio onde será desenvolvida a infecção. No entanto, a adesão não é apenas um mecanismo de infecção ou de tropismo à célula hospedeira, mas um passo essencial ao desenvolvimento da doença a partir da sinalização entre o hospedeiro e patógeno (SVANBORG et al., 1996). Amostras de *A. actinomycetemcomitans* foram isoladas de tecido gengival e de sítios

extra orais, indicando sua capacidade de sobreviver nesses ambientes mobilizando componentes do hospedeiro. Nestes sítios estão constantemente presentes proteínas do soro, seja no exsudato inflamatório do fluido crevicular ou na corrente sanguínea, utilizada para atingir sítios extraorais (TANG-SIEGEL et al., 2016).

Componentes da matriz extracelular podem ser também substrato de adesão para *A. actinomycetemcomitans* e favorecer a colonização de outros sítios além da cavidade oral (TANG et al., 2008). A capacidade de adesão a proteínas da matriz extracelular foi demonstrada para diversas proteínas autotransportadas em outros microorganismos e a capacidade de *A. actinomycetemcomitans* interagir com proteínas da matriz extracelular já foi demonstrada (MINTZ; FIVES-TAYLOR, 1999).

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; GILLET et al., 1982; SAGLIE et al., 1982), indicando colonização bacteriana aos tecidos sub-epiteliais. A matriz extracelular de mamíferos é composta por duas classes de macromoléculas: glicosaminoglicanas (GAGs), ligadas covalentemente a proteínas na forma de proteoglicanas, e proteínas fibrosas com funções estruturais e adesivas, como colágenos, elastina, fibronectina e laminina. A matriz extracelular (ECM) estabiliza a estrutura física de tecidos e regula funções importantes de células eucarióticas como adesão, diferenciação, migração, proliferação, forma e função. Em condições normais, a ECM não está exposta a bactérias e o trauma tecidual, mecânico ou químico, pode facilitar o acesso de patógenos. A exposição de bactérias a ECM pode ainda ocorrer em função da infecção bacteriana através de fatores de virulência como enzimas líticas e toxinas. O acesso aos tecidos sub-epiteliais pode garantir a migração para outros sítios e infecções de maior duração (BARBOSA et al., 2006). A capacidade de interação dos patógenos com componentes da ECM tem um papel importante na adesão e invasão de células do hospedeiro (ATZINGEN et al., 2008).

Colágeno é a proteína mais abundante do corpo humano e o principal componente da matriz extracelular, predominando nos tecidos de válvulas cardíacas (TANG et al., 2008). Laminina é uma proteína altamente glicosilada e um dos principais componentes da lamina basal, estrutura especializada dos tecidos conjuntivos que circundam o epitélio e endotélio. Também é possível encontrar fibronectina e proteoglicanas associadas aos tecidos conjuntivos (MINTZ; FIVES-



TAYLOR, 1999). A interação de proteínas bacterianas com a fibronectina é descrita como uma etapa importante para invasão de células endoteliais (PIROTH et al., 2008). Adesinas auto-transportadas de *A. actinomycetemcomitans* tem sido associada com a ligação a proteínas de matriz extracelular. OMP100 (ApiA), associada à ligação com célula epitelial assim como Aae, liga-se à fibronectina e aos colágenos tipo II, III e V, (KOMATSUZAWA et al., 2002; LI et al., 2004). Outra proteína auto-transportada, EmaA, interage com os colágenos tipo I, II, III, V e à fibronectina (MINTZ; FIVES-TAYLOR, 1999).

A fibronectina é uma proteína multi-domínio, com duas formas principais: a plasmática e a celular. A fibronectina plasmática produzida em hepatócitos pode ser encontrada no sangue, saliva e outros fluidos corporais. A fibronectina celular é secretada por uma variedade de células e incorpora-se à superfície celular e na matriz extracelular (HENDERSON et al., 2011).

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).

Fibrinogênio é uma das mais importantes proteínas de coagulação do plasma e é regulada positivamente durante a inflamação, participando da defesa do organismo. Por outro lado, patógenos podem interagir com fibrinogênio para manipular o sistema imune (RIVERA et al., 2007). A interação de bactérias com o fibrinogênio pode também estar envolvida na patogênese de endocardites infecciosas propiciando a capacidade colonização das válvulas cardíacas (PIROTH et al., 2008).

Plasminogênio é uma proteína encontrada no plasma humano, ativado por proteólise e convertido em plasmina e angiostatina e envolvida em processos de proliferação celular e organização da estrutura da matriz extracelular, além da remodelação tecidual, adesão das células entre si e a diversos substratos. A adesão do plasminogênio com a bactéria permite que a bactéria degrade a matriz extracelular do hospedeiro e membranas basais. *Borrelia burgdorferi* adere ao plasminogênio, e *in vitro*, é capaz de atravessar monocamadas de células endoteliais. A plasmina associada à *B. burgdorferi* pode degradar fibronectina, laminina e vitronectina e leva à degradação das membranas basais (BRISSETTE et al, 2009).

*A. actinomycetemcomitans* apresenta diversas proteínas de superfície (OMPs) antigênicas que contribuem para sua virulência (MINTZ; FIVES-TAYLOR, 1994; MAEDA et al., 2009). O soro de pacientes com periodontite relacionada a *A. actinomycetemcomitans* apresenta anticorpos específicos contra seis proteínas de membrana externa: OMP100, OMP64, OMP39, OMP29, OMP16 e OMP18 (KOMATSUZAWA et al., 1999). OMP100, também denominada ApiA, media a adesão ao epitélio, colágeno e fibronectina (LI et al., 2004).

*A. actinomycetemcomitans* apresenta outras proteínas de superfície relacionadas à adesão. EmaA é uma proteína de membrana externa responsável pela ligação a proteínas da matriz extracelular, particularmente fibronectina e colágeno tipo V (MINTZ, 2004). Esta é uma proteína autotransportada que apresenta dez diferentes genótipos e três estruturas diferentes (intacta, intermediária ou truncada), sendo que apenas os sorotipos b e c contêm as duas formas intactas de moléculas da EmaA, formando estruturas semelhantes a antenas, que são capazes de aderir ao colágeno (TANG et al., 2007). A adesão a proteínas da matriz apresenta interesse não somente pela colonização da cavidade oral, mas a adesina EmaA pode também estar envolvida nos casos de endocardite bacteriana induzidos pela bactéria (TANG et al., 2008).

A proteína Aae é uma adesina não fimbrial com afinidade pelas células epiteliais bucais de humanos e primatas do velho mundo (YUE et al., 2007) e células endoteliais (YUE, 2009). A adesão às células epiteliais gengivais não é mediada exclusivamente por Aae, mas também é promovida pela proteína de membrana externa Omp100, sendo que uma mutante defectiva em *Omp100* e *aae* perdeu a capacidade de ligação com estas células (YUE et al., 2007). A proteína Aae apresentou entre 130kDa e 140kDa, variando entre duas amostras de *A. actinomycetemcomitans* estudadas. Esta diferença pôde também ser observada na seqüência do gene *aae* (conforme Fig. 1), em que ocorrem diferenças principalmente no número de seqüências repetidas no domínio de ligação (ROSE et al., 2003).

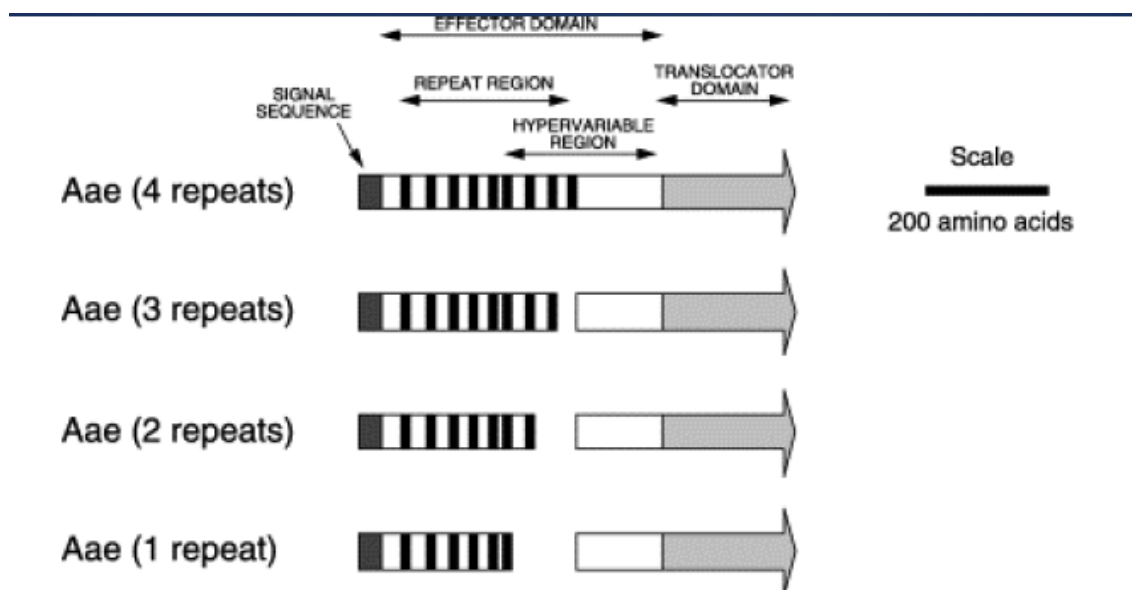


Fig. 1 - Polimorfismo de *aae* descrito por Rose et al., 2013. Figura de Fine et al, 2006. Foram descritos 4 genótipos distintos, representados por diferenças no número de regiões repetidas em *aae* na região do domínio de ligação com a célula epitelial. O genótipo 1 apresenta uma repetição. O genótipo 2 apresenta duas repetições. O genótipo 3 apresenta 3. O genótipo 4 apresenta 4. O presente estudo descobriu e descreveu um novo genótipo *aae* 5, que apresenta 5 repetições e foi sequenciado e teve os dados publicados em periódico internacional como colaborador (PINHEIRO et al., 2011).

Essa proteína é homóloga em seu domínio de passagem às proteínas autotransportadas que utilizam o mecanismo de secreção do tipo V, presentes em organismos de outros gêneros da família *Pasteurellaceae* como *Haemophilus* e *Pasteurella* (ROSE et al., 2003). O domínio de passagem C-terminal com  $\approx$  270 aminoácidos, apresenta 28% de semelhança com os domínios translocadores de IgA1 protease e da adesina Hap de *Haemophilus influenzae*, e 22% com o mesmo domínio da IgA1 protease de *Neisseria meningitidis*. Além disso, uma seqüência de 53 aminoácidos na porção N-terminal também exibe semelhanças com outras proteínas autotranportadoras (HENDERSON; NATARO, 2001). O peptídeo P40, que compreende a região de aminoácidos 201–240 (AQKEAERLANEQEIARQKIKANELQRINEQSKLAEVARV), foi descrito pela literatura como provável domínio efetor de Aae para ligação a células (FINE et al., 2010). Na Fig. 2 podemos observar um esquema da estrutura descrita para a proteína Aae com peptídeo sinal, domínios de efetor e translocador e o P40.

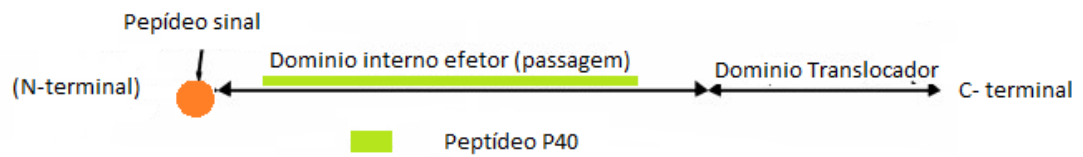


Fig. 2 - Representação esquemática da estrutura descrita para a proteína Aae com peptídeo sinal na porção N-terminal, e os domínios efetor, com a localização do peptídeo P40, e translocador na porção C-terminal.

Apesar das semelhanças no sistema de secreção, as funções das proteínas autotransportadas são variáveis. A proteína autotransportada Hap de *H. influenzae* foi identificada como mediadora de adesão, invasão e formação de microcolônias em ensaios com células do trato respiratório (KENJALE et al., 2009). A proteína autotransportada homóloga Hap de *H. influenzae* media a adesão do patógeno a diversas proteínas da matriz (FINK et al., 2002).

A capacidade de adesão a proteínas da matriz extracelular mediada por proteínas autotransportadas em outros microorganismos foi demonstrada (FINK et al. 2002), assim como a capacidade de *A. actinomycetemcomitans* interagir com proteínas da matriz extracelular (MINTZ; FIVES-TAYLOR, 1999). Pela sua estrutura, Aae é uma candidata a mediar a adesão a componentes da matriz, inclusive a substratos mediados por outras adesinas como EMaA, tendo em vista que algumas bactérias possuem múltiplos receptores descritos com capacidade de interagir a mesmos substratos da matriz extracelular como já descrito anteriormente para laminina e fibronectina, por exemplo (EUCKER; KONKEL, 2012; FENNO et al., 1996; UMEMOTO et al., 1993).

O sucesso da vacina contra a varíola com a erradicação da doença em 1976 e o surgimento de vacinas efetivas que amenizaram ou erradicaram algumas doenças infecciosas deixou clara a importância da imunização profilática contra processos infecciosos (PERSSON, 2005). Algumas proteínas autotransportadas de patógenos são consideradas candidatas a antígenos vacinais, pois anticorpos contra estas são eficientes na prevenção de infecções causadas pelas bactérias produtoras (WELLS et al., 2007). Mesmo proteínas com baixa antigenicidade, podem ser associadas a agentes adjuvantes capazes de potencializar a resposta imune ou facilitar a apresentação dos antígenos facilitando o reconhecimento e desencadeando a resposta imune protetora (PERSSON, 2005). Por exemplo, a inoculação da proteína Hap fusionada a CT (fração não tóxica da toxina colérica) em camundongos

desafiados com *H. influenzae* foi capaz de prevenir a broncopneumonia (YAO et al., 2010).

Aae não figura entre as principais proteínas de membrana externa que reagem contra o soro de pacientes com periodontite agressiva em ensaio de Western Blot (KOMATSUZAWA et al., 2002). A literatura ainda não apresenta dados sobre a resposta de anticorpos contra Aae em pacientes infectados por *A. actinomycetemcomitans* ou sobre o efeito destes anticorpos sobre a colonização pela bactéria e o desenvolvimento da periodontite agressiva. A importância de Aae na virulência e da resposta a esta proteína é comprometida pela especificidade de Aae a células epiteliais de humanos e outros primatas (YUE et al., 2007), impossibilitando o seu estudo em animais experimentais como roedores

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 contra *A. actinomycetemcomitans* nas periodontites. Inicialmente, acreditava-se que níveis plasmáticos mais altos de IgG contra patógenos periodontais 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 *P. gingivalis* foram encontrados em pacientes com periodontite estável quando comparados com aqueles que apresentavam periodontite ativa (RAMS et al., 2006). 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 pacientes 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 (RYLEV; KILIAN, 2008). O clone JP-2 like é associado a 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. A resposta do soro de anticorpos IgG em pacientes 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; GUNSOLLEY et al., 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., 1992).

A reatividade a Omp29 e Omp100 é geralmente associada à reatividade ao sorotipo b, no entanto, a reatividade para este sorotipo nem sempre leva à reatividade para ambas as Omps, especialmente entre os indivíduos de descendência africana, visto que 8 e 7 de 14 indivíduos com periodontite agressiva reativos para este sorotipo, não reagiram a omp29 e omp100, respectivamente. Em estudo com amostras padrão, podemos observar que as amostras sorotipo b JP2 e SUNY 465 (não JP2 like) produzem altos níveis de transcritos do gene *omp29*, enquanto a amostra ATCC 29523, sorotipo a, não apresentou níveis detectáveis de transcritos de *omp29* em nenhuma das condições testadas (UMEDA, 2010). Assim é possível que mesmo as amostras de *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b que colonizam estes indivíduos analisados apresentem expressão diferencial destas Omps.

Periodontites foram associadas a várias doenças, como diabetes, doenças cardiovasculares, artrite e alterações gestacionais (ZI et al., 2016), mas os mecanismos envolvidos nestas associações ainda não foram completamente esclarecidos. As hipóteses mais aceitas são as que indicam a colonização de sítios extra-orais por bactérias orais que sofreram bacteremia, como a colonização da placenta e de placas de ateroma (AMADOR et al., 2010; ZI et al., 2016), e a exacerbação da resposta inflamatória mediada pela infecção oral (ZI et al., 2016).

A resposta de anticorpos contra determinado agente pode ser relacionada ao nível de infecção, mas também pode indicar diferenças na resposta do hospedeiro aos antígenos bacterianos. Dados de um estudo epidemiológico mostraram que não houve associação significativa entre doença cardiovascular e doença periodontal, porém os níveis de anticorpos séricos para *T. denticola*, *P. intermedia*, *C. ochracea* e *V. parvulla* foram associados de maneira significativa às doenças coronarianas em pacientes fumantes, enquanto que os níveis séricos contra *P. nigrescens*, *A. actinomycetemcomitans* e *C. ochracea* foram associados à doença coronariana em pacientes que nunca fumaram (BECK et al., 2005). Por outro lado, a incidência de infarto foi associada com o nível de anticorpos séricos contra *P. gingivalis*, mas não contra *A. actinomycetemcomitans* (PUSSINEN, et al., 2007). A falta de função

opsonofagocítica pode ser atribuída à discrepância entre a resposta de anticorpos e proteção (DABO et al., 2008). A eficácia de um antígeno depende do tipo da resposta imune e as propriedades das células efetoras (macrófagos e células dendríticas) do sistema imunológico. De fato, um determinante da proteção contra um determinado agente patogênico está no equilíbrio entre resposta imune Th1 e Th2. O sucesso da resposta imune também está associado à dose do agente protetor aplicada sobre determinado antígeno (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008).

Micro-organismos patogênicos e comensais tem componentes [padrões de reconhecimento PAMPS -padrões moleculares associados a patógenos] reconhecidos por receptores do hospedeiro denominados genericamente como PRRs (receptores de reconhecimento de padrões). Entre os PRRs destacam-se os toll-like receptors (TLRs). Quando TLRs de células epiteliais reconhecem patógenos inicia-se a sinalização que culmina secreção de substâncias antimicrobianas e recrutamento de células fagocíticas aos tecidos mucosos adjacentes, visando a eliminação dos patógenos. Existem teorias de que os fatores de virulência bacterianos poderiam participar da regulação dos seus receptores do hospedeiro para desencadear uma resposta inflamatória favorável ao seu estabelecimento no hospedeiro e desenvolvimento do processo infeccioso (SIRARD et al., 2006).

A hipótese deste estudo é de que Aae de *A.actinomycetemcomitans* é uma adesina relevante para a patogenia causada pelo patógeno, favorecendo a adesão não somente às células epiteliais mas também a proteínas da matriz celular, sem induzir forte resposta de anticorpos nos pacientes com periodontite agressiva, permitindo assim, a evasão das defesas e a colonização dos tecidos do hospedeiro.

## CONCLUSÕES

- O gene *aae* apresenta 1 a 5 repetições na região do domínio efetor, no entanto não existe correlação entre o polimorfismo do gene *aae* e a capacidade de adesão da amostra a células epiteliais KB;
- Apesar de pacientes com periodontite agressiva responderem com anticorpos séricos do tipo IgG contra a célula total de *A. actinomycetemcomitans*, não ocorre resposta de anticorpos séricos contra a adesina Aae.
- Anticorpos policlonais contra Aae e contra o domínio efetor de Aae (peptídeo P40) não foram capazes de inibir a adesão a células epiteliais ou exercer papel como opsonizante para estimular a fagocitose por macrófagos murínicos.
- A proteína recombinante Aae<sup>His</sup> liga-se a diferentes proteínas ECM como plasminogênio, fibrinogênio, fibronectina celular e plasmática, laminina e colágenos tipo V; A ligação de Aae<sup>His</sup> à fibronectina é, pelo menos em parte, devido à ligação ao domínio F45 de fibronectina.
- A comparação da ligação da amostra selvagem às pECM com a da amostra mutante defectiva em Aae confirmou a afinidade de Aae ao plasminogênio, e foi observada tendência de ligação ao fibrinogênio, fibronectina plasmática, laminina.

O presente estudo revelou que a adesina Aae de *A. actinomycetemcomitans* não é imunogênica, o que poderia representar uma estratégia de evasão das defesas do hospedeiro. Além disso, nossos dados revelam que Aae é capaz de promover a ligação da bactéria não somente às células epiteliais, mas também a diferentes proteínas da matriz celular e do soro, como plasminogênio, fibrinogênio, fibronectina plasmática, e laminina. Esta característica multifuncional da adesina Aae sugere a sua importância na colonização por *A. actinomycetemcomitans* não apenas da cavidade oral, mas também de sítios extra-orais.



## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

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.

AMADOR, C.; RIBEIRO A.; GONNELLI C.A.; OTA-TSUZUKI C.; RANGEL, L.P.; SABA-CHUJIFI, E; MAYER, MPA Diversity of bacteria in atheroma plaques in brazilian patients 88th General Session and Exhibition of the IADR, **Abst.** Barcelona., 2010.

AMARASINGHE, J.J.; SCANNAPIECO, F.A.; HAASE, E.M. Transcriptional and translational analysis of biofilm determinants of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in response to environmental perturbation. **Infect Immun.**, v. 77, n. 7, p. 2896-2907, 2009.

ANDO, E. S. **Toxina distensora citoletal (CDT): análise dos níveis de IgG sérica em pacientes com diferentes condições periodontais e efeito na inibição da atividade macrofágica.** 55p. Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ANDO, E. S., L. A.; DE-GENNARO, M.; FAVERI, M. FERES, J. M.; DIRIENZO; MAYER, M. P. Immune response to cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in periodontitis patients **J Periodontal Res**, v. 45, n. 4, p. 471-480, 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, p. 46-53, 2014.

DE ANCOS ARACIL C; ESTRADA PÉREZ V; ALVAREZ DE ARCAYA A; CHANTRES ANTORANZ MT. AN Endocarditis caused by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* **Med Interna.**, v. 16, n. 12, p. 633-634, 1999.

ASAKAWA, R.; KOMATSUZAWA, H.; KAWAI, T.; YAMADA, S.; GONCALVES, 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 virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Mol Microbiol.**, v.50, n. 4, 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.

ARMITAGE, C.G. Development of a classification system for periodontal diseases and

---

<sup>1</sup> \* De acordo com:

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

conditions. **Ann. Periodontol.**, v.4, p.1-6, 1999.

ATZINGEN, M.V.; BARBOSA, A.S.; DE BRITO, T.; VASCONCELLOS, A.S.; DE MORAIS, Z.M.; LIMA, D.M.; ABREU, P.A.; NASCIMENTO A.L. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiol.** v. 8, 2008

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.

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.

BAMFORD, C.V.; FENNO, J.C., J; NKINSON, H.F.; DYMOCK, D. The chymotrypsin-like protease complex of *Treponema denticola* ATCC 35405 mediates fibrinogen adherence and degradation. **Infect Immun.**, v. 75, p. 4364-72, 2007.

BECK J.D.; EKE P.; HEISS G.; MADIANOS P.; COUPER D.; LIN D.; MOSS K.; ELTER J. Offenbacher S. Periodontal disease and coronary heart disease: a reappraisal of the exposure. **Circulation.**, v. 112, p. 19-24, 2005.

BENTANCOR, L.V.; ROUTRAY, A.; BOZKURT-GUZEL, C.; CAMACHO-PEIRO, A.; PIER, G.B.; MAIRA-LITRÁN, T. Evaluation of the trimeric autotransporter Ata as a vaccine candidate against *Acinetobacter baumannii* infections. **Infect Immun.**, v.80, n. 10, p. 3381-3388, 2012.

BRADFORD, M. 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.

BRISSETTE CA, HAUPT K, BARTHEL D, COOLEY AE, BOWMAN A, SKERKA C, WALLICH R, ZIPFEL PF, KRAICZY P, STEVENSON B *Borrelia burgdorferi* infection-associated surface proteins ErpP, ErpA, and ErpC bind human plasminogen. **Infection and immunity.**, v. 77, p. 300-306, 2009.

BRUNHEIRA, A.T.P. **Detecção de *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* no biofilme subgingival e títulos séricos IgG contra OMP100 e OMP29.** São Paulo, 2007.80p.[Tese (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

BUCIOR, I.; PIELAGE, J.F.; ENGEL, J.N. *Pseudomonas aeruginosa* Pili and Flagella Mediate Distinct Binding and Signaling Events at the apical and Basolateral Surface of Airway Epithelium. **PLoS Pathog** v. 8, n.4, 2012.

CALANDRINI, CA.; RIBEIRO, A.C.; GONNELLI, A.C.; OTA-TSUZUKI, C.; RANGEL, L.P.; SABA-CHUJFI, E.; MAYER, M.P. Microbial composition of atherosclerotic plaques. **Oral Dis.**, v. 20, p. 128-34, 2014.

CALIFANO J.V.; SCHENKEIN 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.

CARVALHO, E.; CHING CHING, A.T.; ESTIMA ABREU, P.A.; HO, P.L.; BARBOSA, A.S.; Breaking the bond: recent patents on bacterial adhesins. **Recent Pat DNA Gene Seq;** v. 6, n. 2, p. 160-171, 2012.

CHAMBERS, S.T., MURDOCH D., MORRIS A., et al. HACEK Infective Endocarditis: Characteristics and Outcomes from a Large, Multi-National Cohort. Abbate A, ed. **PLoS ONE.** v. 8, n. 5, e63181, 2013.

CUTTER, D.; MASON K.W.; HOWELL A.P.; FINK D.L.; GREEN B.A.; ST GEME J.W. 3RD, Immunization with *Haemophilus influenzae* Hap adhesin protects against nasopharyngeal colonization in experimental mice. **J.I.D.** v. 186, n. 15, p. 115- 121 2002.

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.

DAHLE´N G; MANJI F; BAELUM V; FEJERSKOV O. Black-pigmented *Bacteroides* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque of adult Kenyans. **J Clin Periodontol.**, v. 16, p. 305–310, 1989.

DAMY, S. B.; CAMARGO, R. S.; CHAMMAS, R.; FIGUEIREDO, L.F. P.; Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental **Rev Assoc Med Brás.**, v. 56, n.1, p. 103-111, 2010.

DAHLE´N G, LINDHE J, SATO K, HANAMURAH, OKAMOTO H. The effect of supragingivalplaque control on the subgingival microbiota in subjects with periodontal disease. **J Clin Periodontol.**, v.19, p. 802–809, 1992.

DAS M.; BADLEY A.D.; COCKERILL F.R.; STECKELBERG J.M.; WILSON W.R. Infective endocarditis caused by HACEK microorganisms. **Annu Rev Med.**; v. 48, p. 25-33, 1997.

DESHPANDE S.S. Assay Development, Evaluation, and Validation. In: Deshpande SS, ed. **Enzyme Immunoassays from Concept to Product Development.** New York: Chapman & Hallp., 343– 349, 1996.

DIEHL, S.R.; WU, T.; BURMEISTER, J.A.; CALIFANO, J.V.; BROOKS, C.N.; TEW,

J.G.; SCHENKEIN, H.A. Evidence of a substantial genetic basis for IgG2 levels in families with aggressive periodontitis. **J Dent Res.**, v. 82, n. 9, p. 708 – 712, 2016

EBERSOLE, J.L.; CAPPELLI, D.; STEFFEN, M.J.; Longitudinal dynamics of infection and serum antibody in *A. actinomycetemcomitans* periodontitis. **Oral Dis.** v.1, n.3, p. 129-138, 1995.

ELLEN, R. P. Perturbation and exploitation of host cell cytoskeleton by periodontal pathogens. **Microbes Infect.**, v. 1, n. 8, p. 621-632, 1999.

EUCKER, T.P.; KONKEL, M.E. The cooperative action of bacterial fibronectin-binding proteins and secreted proteins promote maximal *Campylobacter jejuni* invasion of host cells by stimulating membrane ruffling. **Cell Microbiol.**, v. 14 n. 2, p. 226-238, 2012.

FAVERI, M. **Identificação de possíveis organismos associados à periodontite agressiva por análise clonal de 16SrRNA.** 2007. [Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

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.

FENNO, J.C.; MÜLLER, K.H.; MCBRIDE, B.C. Sequence analysis, expression, and binding activity of recombinant major outer sheath protein (Msp) of *Treponema denticola*. **J Bacteriol.**, v. 178, p. 2489-2497, 1996.

FIVES-TAYLOR P; MEYER D; MINTZ K. Characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* invasion of and adhesion to cultured epithelial cells. **Adv Dent Res.** v. 9, p. 55–62, 1995.

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

FINE, D.H.; KAPLAN, J.B.; FURGANG, D.; KARCHED, M.; VELLIYAGOUNDER, K.; YUE, G. Mapping the epithelial-cell-binding domain of the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* autotransporter adhesin Aae. **Microbiology.**, v. 156, n. 11, p. 3412-3420, 2010.

FINK, D.; GREEN, B.A.; St GEME III, J.W. The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter binds to fibronectin, laminin, and collagen IV. **Infec. Immun.**, v. 70, n. 9, p. 4902-4907, 2002.

FISCHER, H., YAMAMOTO, M., HOEBE, K.; AKIRA, S.; BEUTLER, B.; SVANBORG, C., Mechanism of pathogen specific TLR4 activation in the mucosa: Fimbriae,

recognition receptors and adaptor protein selection. *Eur. J. Immunol.*, v. 36, p. 267–277, 2006.

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.

GEWIRTZ, A.T.; YU, Y., KRISHNA, U.S. ; ISRAEL, D.A. ; LYONS SL, PEEK R.M. J.R. *Helicobacter pylori* flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity. *J Infect Dis.*, v. 189, n. 10, p.1914-1920, 2004.

GOLDBERG; M.H.; KATZ J. Infective endocarditis caused by fastidious oropharyngeal HACEK micro-organisms. *J Oral Maxillofac Surg.*, v. 64, n. 6, p. 969- 71, 2006.

GUEDES, A. M. **Espectrometria Raman, UV, DOS e Circular Dicroísmo de alcalóides do cigarro.** 74 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

GUTIÉRREZ-VENEGAS, G.; KAWASAKI-CÁRDENAS, P.; GARCÉS, C.P.; ROMÁN-ALVÁREZ, P.; BARAJAS-TORRES, C.; CONTRERAS-MARMOLEJO, L.A. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* adheres to human gingival fibroblasts and modifies cytoskeletal organization *Cell Biol Int.*, v. 31, n. 9, p. 1063-1068, 2007.

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.

HARRIS J.A.; ROY K.; WOO-RASBERRY V.; HAMILTON D.J.; KANSAL R.; QADRI F.; FLECKENSTEIN J.M. Directed evaluation of enterotoxigenic *Escherichia coli* autotransporter proteins as putative vaccine candidates. *PLoS Negl Trop Dis.*, v.5, n. 12, e1428, 2011.

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. Highlytoxic 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.

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, 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, I.R.; NATARO, J.P. Virulence functions of autotransporter proteins. **Infect Immun.**, v. 69, p. 1231-1243, 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.

HWANG A.M.; STOUPEL J.; CELENTI R.; DEMMER R.T.; PAPAPANOU P.N. Serum Antibody Responses to Periodontal Microbiota in Chronic and Aggressive Periodontitis: A Postulate Revisited. **J Periodontol.**, v. 85, n. 4, p. 592-600, 2014.

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. 29, n. 6(4): e18287, 2011.

KANASI E.; DOĞAN B.; KARCHED M.; THAY B.; OSCARSSON J.; ASIKAINEN S. Lack of serotype antigen in *A. actinomycetemcomitans*. **J Dent Res.**, v. 89, n. 3, p. 292-296, 2010.

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

KAWAMOTO, D. **Atividade tóxica distensora citoletal e genotipagem por PCR da região *cdt* e da região promotora do operon *Itx* de isolados clínicos de *A. actinomycetemcomitans*.** 2005. [Tese (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

KAWAMOTO, D.; ANDO, E.S.; LONGO, P.L.; NUNES; A.C.R.; WIKSTROM M. & MAYER; M.P.A. Genetic diversity and toxic activity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolates. **Oral Microbiol Immunol.**, v. 24, n. 6, p. 493- 501, 2009.

KENJALE, R.; MENG, G.; FINK, D.L.; JUEHNE, T.; OHASHI, T.; ERICKSON, H.P.; WAKSMAN, G.; ST GEME, J.W. 3RD. Structural determinants of autoproteolysis of the Haemophilus influenzae Hap autotransporter. **Infect Immun.**, v. 77, n. 11, p. 4704-4713, 2009.

KINANE D.F.; SHIBA H.; STATHOPOULOU P.G.; ZHAO H.; LAPPIN D.F.; SINGH A.; ESKAN M.A.; BECKERS S.; WAIGEL S.; ALPERT B.; KNUDSEN T.B. Gingival epithelial cells heterozygous for *Tolllike* receptor 4 polymorphisms Asp29 9Gly

and Thr399ile are hypo-responsive to *Porphyromonas gingivalis*. **Genes Immun.**, v. 7, n. 3, p.190-200, 2006.

KINANE, D.F.; MOONEY, J.; EBERSOLE, J.L. Humoral immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. **Periodontol.** 2000, v.2, p.289-340, 1999.

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.

KIMIZUKA R.; KATO T.; HASHIMOTO S.; YAMANAKA-OKADA A.; OKUDA K.; ISHIHARA K. Congo red-binding protein in rough-phenotype *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is amyloid-like fiber. **Bull Tokyo Dent Coll.**, v. 50, n. 1, p. 23-29, 2009.

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.

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.

LAMPE A.S.; SCHROIJEN M.A.; SMITH S.J. Endocarditis due to *Aggregatibacter* (formerly: *Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*, a bacterium that grows in characteristic star-shaped colonies **Ned Tijdschr Geneesk.**, v. 152, n. 44, p. 827-830, 2008.

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

LIU, D.F.; MASON K.W.; MASTRI M.; PAZIRANDEH M.; CUTTER D.; FINK D.L.; ST GEME J.W. 3RD; ZHU D.; GREEN B.A. The C-terminal fragment of the internal 110-kilodalton passenger domain of the Hap protein of nontypeable *Haemophilus influenzae* is a potential vaccine candidate. **Infect Immun**, v. 72, n. 12, p. 6961-6968, 2004.

LIU, Yunling; TAO, Lan. Protein structure prediction based on an improved genetic algorithm. In: Bioinformatics and Biomedical Engineering, 2008. ICBBE 2008. **The 2nd International Conference on.** IEEE, 2008. p. 577-580.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock.** 10ª edição, 1ª reimpressão, São Paulo, SP, 608p., 2008.

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, 2010.

MARSH P.D.; ZAURA E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. **J Clin Periodontol.**, v.44, S12-S22, 2017.

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. The role of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of periodontal disease. **Trends Microbiol.**, v.5, p.224-228, 1997.

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 human oral cell line. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 9, p. 3672-3678, 1994.

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

NAMEKAR, M.; KUMAR, M.; O'CONNELL M.; NERURKAR, V.R. Effect of serum heat-inactivation and dilution on detection of anti-WNV antibodies in mice by West Nile virus E-protein microsphere immunoassay. **PLoS One.**, v. 7, e45851, 2012.

NAKASHIMA K.; USUI C.; KOSEKI T.; NISHIHARA T.; ISHIKAWA I. Two different types of humoral immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in high-responder periodontitis patients. **J. Med Microbiol.**, v. 47, n. 7, p. 569-575, 1998.

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

NUNES, A. C. R.; LONGO, P. L.; MAYER, M. P. A. Influence of Aae Autotransporter Protein on Adhesion and Biofilm Formation by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 3, p. 255-260, 2016.

NUNES, A.C.R. **The role of the adhesin Aae in the adhesion to KB epithelial cells, extracellular matrix proteins and saliva-coated hydroxyapatite, and its influence on hydrophobic properties and biofilm formation by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.** 126 p. Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.



OKUDA T, KOKUBU E, KAWANA T, SAITO A, OKUDA K, ISHIHARA K. Synergy in biofilm formation between *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella species*. **Anaerobe.**, v. 18, n. 1, p.110-116. 2012.

OLSEN, I.; SHAH, H.N.; GHARBIA, S.E. Taxonomy and biochemical characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. **Periodontol** **2000**, v.2, p.14-52, 1999.

OUHARA, K.; KOMATSUZAWA, .H; SHIBA, H.; UCHIDA, Y.; KAWAI, T.; SAYAMA, K.; HASHIMOTO, K.; TAUBMAN, M.A.; KURIHARA, H.; SUGAI, M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* outer membrane protein 100 triggers innate immunity and production of beta-defensin and the 18-kilodalton cationic antimicrobial protein through the fibronectin-integrin pathway in human gingival epithelial cells. **Infect Immun.**, v. 74, n. 9, p. 5211-5220, 2006.

PATTI, J.M.; HÖÖK, M. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. *Curr Opin Cell Biol.*, v. 6, p. 752-758, 1994.

PATUREL L.; CASALTA J.P.; HABIB G.; NEZRI M.; RAOULT D. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* endocarditis. **Clin Microbiol Infect.** v. 10, n. 2, p. 98- 118, 2004.

PARHAM, P. **The Immune System Garland Science Publishing**, 3<sup>rd</sup> ed., 506p., New York, NY, 2009.

PERSSON, G. R., Immune responses and vaccination against periodontal infections. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, p. 39–53, 2005.

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

PIROTH, L., QUE, Y.-A., WIDMER, E., PANCHAUD, A., PIU, S., ENTENZA, J. M., & MOREILLON, P. The Fibrinogen- and Fibronectin-Binding Domains of *Staphylococcus aureus* Fibronectin-Binding Protein A Synergistically Promote Endothelial Invasion and Experimental Endocarditis. **Infection and Immunity.**, v. 76, n. 8, p. 3824–3831, 2008.

PUSSINEN P.J.; NYSSÖNEN K.; ALFTHAN G.; SALONEN R.; LAUKKANEN J.A.; SALONEN J.T. Serum antibody levels to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* predict the risk for coronary heart disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 25, p. 833-838, 2005.

QUE Y-A; HAEFLIGER J-A; PIROTH L, et al. Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. **The Journal of Experimental Medicine.**, v. 201, n. 10, p. 1627- 1635, 2005.

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.

RIVERA J.; VANNAKAMBADI G.; HÖÖK M.; SPEZIALE P. Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria. **Thromb Haemost.**, v. 98, p. 503-511, 2007.

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, n.5, p. 2384-2393, 2003.

ROST B.; YACHDAV G.; LIU J. The PredictProtein server. **Nucleic Acid Res.**, v. 32, p. 321-326, 2004.

RUPANI D; IZANO E.A.; SCHREINER H.C.; FINE D.H.; KAPLAN J.B. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotype f O-polysaccharide mediates coaggregation with *Fusobacterium nucleatum*. **Oral Microbiol Immunol.**, v. 23, n. 2, p. 127-130, 2008.

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

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 Periodontal Res.**, v. 17, p.452-5, 1982.

SCHENKEIN, H.A.; BARBOUR, S.E.; TEW, J.G. Cytokines and inflammatory factors regulating immunoglobulin production in aggressive periodontitis. **Periodontol 2000.**, v. 45, p. 113-127, 2007.

SIMS, T.J.; MONCLA, B.J.; DARVEAU, R.P.; PAGE, R.C. Antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* recognized by patients with juvenile periodontitis and periodontally normal subjects. **Infect Immun.** v.59, n. 3, p.913- 924, 1991.

SHARMA, K., MUDGIL, P., WHITEHALL J.S., GOSBELL. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* osteomyelitis in a 12-year-old boy: case report emphasizing the importance of tissue culture, and review of literature. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.** v.16, p. 12. 2017.

SILVA, M. P. **OMP29 de Aggregatibacter actinomycetemcomitans: análise filogenética, interação com proteínas de matriz e resposta de células epiteliais.** 2016. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-17082016-100709/>>. Acesso em: 2017-02-17

SIRARD J. C., BAYARDO M., DIDIERLAURENT A. Pathogen-specific TLR signaling in mucosa: Mutual contribution of microbial TLR agonists and virulence factors **European Journal of Immunology**, V. 36, n. 2, p. 260–263, 2006.

SLOTS, J.; LISTGARTEN, M.A. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases **J Clin Periodontol.** v.15, n. 2, p.85-93, 1988.

SLOTS, J.; ZAMBON, J. J.; ROSLING, B. G.; REYNOLDS, H. S.;

CHRISTERSSON, L. A.; GENCO, R. J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. **J. Periodontal. Res.**, v.17, p.447-448, 1982.

SOCRANSKY S.S.; HAFFAJEE A.D. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. **J Periodontal Res.**, v. 26, n. 3, p. 195-212, 1991.

SVANBORG C, HEDLUND M, CONNELL H, AGACE W, DUAN RD, NILSSON A, WULLT B. Bacterial adherence and mucosal cytokine responses. Receptors and transmembrane signaling. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 797, p. 177-190, 1996.

TAKADA K.; SAITO M.; TSUZUKIBASHI O.; KAWASHIMA Y.; ISHIDA S.; HIRASAWA M. Characterization of a new serotype g isolate of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Mol Oral Microbiol.**, v.25, n. 3, p.200-206, 2010.

TAKAHASHI K.; NISHIMURA F.; KURIHARA M.; IWAMOTO Y.; TAKASHIBA S.; MIYATA T.; MURAYAMA Y. Subgingival microflora and antibody responses against periodontal bacteria of young Japanese patients with type 1 diabetes mellitus. **J Int Acad Periodontol.**; v. 3, p.104-111, 2001.

TANG, G.; RUIZ, T.; BARRANTES-REYNOLDS, R.; MINTZ, K.P. Molecular heterogeneity of EmaA, an oligomeric autotransporter adhesin of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. **Microbiology**, v. 153, p. 2447-2457, 2007.

TANG, G.; KITTEN, T.; MUNRO, C.L.; WELLMAN G.C.; MINTZ K.P. EmaA, a potential virulence determinant of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in infective endocarditis. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 2316-2324, 2008.

TANG G.; MINTZ K.P. Glycosylation of the collagen adhesin EmaA of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is dependent upon the lipopolysaccharide biosynthetic pathway. **J Bacteriol.**, v. 192, n. 5, p. 1395-404, 2010.

TANG-SIEGEL G.; BUMGARNER R.; RUIZ T.; KITTICHOTIRAT W.; CHEN W.; CHEN C. Human Serum-Specific Activation of Alternative Sigma Factors, the Stress Responders in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **PLoS One.**, v. 4, n. 11(8), 2016.

TEIXEIRA, R.E.; MENDES, E.N.; ROQUE DE CARVALHO, M.A.; NICOLI, J.R.; FARIAS, L.D.E.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.

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.

UMEMOTO R.; ASAKURA S.; KARIYA Y.; YONEKAWA M. et al. Cellular fibronectin in plasma: its implications in fibrinogen-associated cryoprecipitation and other related reactions. **Blood Coagul Fibrinolysis.**, v. 4, p. 127-131, 1993.

WAKABAYASHI H.; KONDO I.; KOBAYASHI T.; YAMAUCHI K.; TOIDA T.; IWATSUKI K.; YOSHIE H. **Periodontitis, periodontopathic bacteria and lactoferrin. Biometals.** 2010 Feb 14.

WELLS, T. J.; TREE J. J.; ULLET G. C.; SCHEMBRI, M. A. Autotransporter proteins: novel targets at the bacterial cell surface. **FEMS Microbiology Letters** 274:2, 163-172, 2007.

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(11-12), p. 981-3, 2008.

YAO F, LI WY, KUANG Y, LI MY, FENG F, FENG W, ZHANG Q. Expression and biological activity identification of recombinant Hap protein of NTHi **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.**, v 30, n.5, p. 953-6, 2010.

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 Immun.** 75(9):4440-8. 2007.

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

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

ZAMBON, J.J.; SUNDAY, G.J.; SMUTKO, J.S. Molecular genetic analysis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* epidemiology. **J Periodontol.**, v. 61, p. 75-80, 1990.

ZI, Marcela Yang Hui. **Efeitos da infecção experimental por Porphyromonas gingivalis e Aggregatibacter actinomycetemcomitans no padrão de prenhez de**

**camundongos e em marcadores inflamatórios.** 2016. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. Disponível em:

<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-19012017-104637/>>.

Acesso em: 2017-03-17.