

A importância dos fatores de virulência do *A. actinomycetemcomitans* no desenvolvimento da doença periodontal agressiva

Vinicius Barreto de Souza Campos¹

Carlos Marcelo Figueredo²

Resumo

A doença periodontal é caracterizada por alterações morfológicas nas estruturas de suporte dos dentes e é causada pela interação de subgrupos bacterianos com um indivíduo suscetível. Essa interação é necessária porque a presença de periodontopatógenos pode ser frequentemente detectada em pacientes saudáveis. Isso indica que nem todos os indivíduos são igualmente suscetíveis e (ou) que há uma variação na virulência e potencial patogênico. Frequentemente acredita-se que bactérias Gram-negativas estão envolvidas na iniciação da doença periodontal inflamatória. Um dos principais microrganismos implicados em algumas formas de doença periodontal é o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Embora o mecanismo exato de patogenicidade do *A. actinomycetemcomitans* não seja claro, vários fatores de virulência têm sido caracterizados. Esses fatores incluem: adesão e invasão de células epiteliais, lipopolissacarídeos, fatores inibitórios para fibroblastos, leucotoxina e fatores inibitórios para quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares.

Palavras-chave: fatores de virulência; *A. actinomycetemcomitans*; doença periodontal.

INTRODUÇÃO

A doença periodontal compreende um grupo de condições inflamatórias dos tecidos de suporte dos dentes, causadas por bactérias (NISENGARD; NEWMAN; ZAMBON, 1997). A associação de espécies bacterianas específicas com a doença periodontal surgiu no início dos anos 60, quando o exame microscópico da placa revelou que diferentes morfotipos bacterianos eram encontrados na saúde periodontal *versus* sítios com doença periodontal (JORGE, 1998). O aprimoramento técnico dos procedimentos usados para isolar, cultivar e identificar microrganismos periodontais resultou

em refinamento da taxonomia bacteriana e na classificação de grupos específicos de microrganismos presentes em doenças do periodonto (HARASZTHY; ZAMBON, 1997).

A microbiota periodontal é uma comunidade complexa de microrganismos, muitos dos quais ainda são difíceis ou impossíveis de se isolar em laboratório. Múltiplas espécies que funcionam como patógenos em um sítio podem estar presentes em menor número em sítios saudáveis. Isso significa que a presença de periodontopatógenos pode ser frequentemente

¹ Especialista em Periodontia (PUC-RJ)

² Professor Adjunto de Periodontia da PUC-RJ, UERJ e UNIGRANRIO.

Correspondência para / Correspondence to:

Vinicius Barreto de Souza Campos

R. Pedro Lago, 75/201, Jardim Oceânico - Barra da Tijuca.

22621-110 Rio de Janeiro - RJ - Brasil.

Tel: (21)2483-7927 / (21)9366-2718.

E-mail: viniscampos@yahoo.com.br.

detectada em pacientes saudáveis (CORTELLI et al., 2003). A interpretação de dados microbiológicos é grandemente influenciada pela classificação clínica da condição da doença (LOTUFO; PANNUTI, 2001).

Apesar das dificuldades inerentes à caracterização da microbiota das doenças periodontais, um pequeno grupo de patógenos é reconhecido devido à sua associação com a doença, e o *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Aa*) está incluído nesse grupo (LOTUFO; PANNUTI, 2001).

O *Aa* é um bastonete gram-negativo curto, não formador de esporo, imóvel, anaeróbico facultativo (SLOTS, 1997), sacarolítico e forma pequenas colônias convexas com um “centro estrelado” quando cultivadas em agar-sangue (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1999).

O *Aa* é descrito na literatura por possuir cinco sorotipos que são: a, b, c, d, e (SAARELA et al., 1992), mas recentemente um possível novo sorotipo (f) foi descrito por Kaplan e colaboradores (2001). Os antígenos determinantes do sorotipo são polissacarídeos de superfície termoestáveis que aparentam ser exclusivos da espécie. O sorotipo b parece ser o mais virulento (SLOTS, 1997).

O *Aa* possui vários mecanismos potenciais de virulência, tais como a presença da leucotoxina, fatores imunossupressores, atividade de lipopolissacarídeos, ativação policlonal de células, inibição de fibroblastos, células endoteliais e atividade de células epiteliais, além da capacidade de invadir os tecidos do hospedeiro. Esses fatores parecem contribuir para o início e a progressão da doença periodontal (SLOTS, 1997).

O presente trabalho teve como objetivo analisar alguns dos diversos fatores de virulência do *Aa* e verificar a relação dos mesmos com o início e a progressão da doença periodontal.

ALGUNS FATORES DE VIRULÊNCIA RESPONSÁVEIS PELO INÍCIO E PELA PROGRESSÃO DA DOENÇA PERIODONTAL

O *Aa* tem a capacidade de aderir a células epiteliais, dentes e outras bactérias, consti-

tuindo o passo inicial para colonização e patogênese nos quadros de periodontite. Além do mais, existem outros fatores que podem estar relacionados com a progressão da doença periodontal (GASPARETTO; ARANA-CHAVES; ÁVILA-CAMPOS, 2000), tais como a presença de proteínas na membrana externa (Omps), identificadas por Komatsuzawa e colaboradores (2002) e denominadas de Omp 100, Omp 64, Omp 39, Omp 29, Omp 18 e Omp 16.

Outra proteína encontrada na superfície celular e nas vesículas da membrana celular é a proteína GroEL (membro da família da proteína de choque térmico 60 ou hsp60), que possui uma forte atividade citotóxica. Essas proteínas do choque térmico sofrem uma sobre-expressão sob condições estressantes, como aumento de temperatura ou limitação de nutrientes. Especula-se que essas proteínas iniciam doenças inflamatórias crônicas nas quais respostas autoimunes à hsp60 de humanos podem ser a causa da patologia (DE GRAEFF-MEEDER, 1993). Sugere-se que há um alto grau de homologia entre as proteínas do choque térmico do hospedeiro e que podem ser expresso por patógenos levando a uma resposta auto-imune (TABETA; YOSHIE; YAMAZAKI, 2001). Goulhen e colaboradores (1998) investigaram a localização subcelular, ultra-estrutura e atividade citotóxica da proteína GroEL. Essa proteína é substancialmente aumentada após um choque térmico. A proteína GroEL foi detectada mais em células “estressadas”, se comparadas a células “não stressadas”, e a maioria não estava diretamente associada à membrana externa, mas sim ao material extracelular.

A presença de alguns polissacarídeos, que fazem parte da estrutura do *Aa*, pode tanto induzir (YAMAGUCHI et al., 1996) quanto inibir (OHGUCHI et al., 2003) algumas citoquinas inflamatórias; eles têm sido apontados como importantes fatores de virulência na patogênese de muitas formas de doença periodontal (UEDA et al., 1998).

Outro fator de virulência do *Aa* é a presença de uma leucotoxina de natureza termolábil, capaz de destruir neutrófilos e monócitos/macrófagos humanos *in vitro*, além

de algumas linhagens de células T e B (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1999).

A toxina citoletal de expansão (cdt) do *Aa* é descrita como uma citotoxina com propriedades imunossupressoras, capaz de conter o ciclo celular dos linfócitos (TAN; SONG; ONG, 2002).

ANÁLISE SOBRE A FORMA COMO ESSES FATORES PODEM ATUAR NA DOENÇA PERIODONTAL

Ao verificar a capacidade de adesão do *Aa* às células epiteliais orais, Ávila-Campos e colaboradores (2000) observaram que não houve correlação entre a hidrofobicidade da bactéria e a adesão às células epiteliais, provavelmente por diferenças na metodologia do estudo, porque já é aceito, na literatura, que a hidrofobicidade da superfície do *Aa* é importante para a interação com as células do hospedeiro. Já Gasparetto, Arana-Chaves e Ávila-Campos (2000) relacionaram o aspecto morfocolonial com o tipo de interação intercelular e verificaram que, quando as bactérias apresentavam-se em grumos, não houve aderência adequada às células do hospedeiro. Como foram feitos vários subcultivos, no décimo subcultivo, 14 dos 21 isolados testados apresentaram significativo aumento nas taxas de aderência, provavelmente devido à perda da capacidade de formar grumos.

Os dois estudos mencionados acima avaliaram a capacidade de adesão do *Aa* às células epiteliais orais. Ambos demonstraram uma grande capacidade de adesão entre eles, porém Gasparetto, Arana-Chaves e Ávila-Campos (2000) pareceram mais específicos ao relacionar o aspecto morfocolonial dos isolados com a adesão. Ávila-Campos e colaboradores (2000) verificaram uma relação negativa entre a hidrofobicidade e a adesão, mas não buscaram verificar, no estudo, uma relação entre a adesão com alguma característica específica do *Aa*. Lepine e colaboradores (1998) verificaram que alguns isolados aderiram melhor às células epiteliais KB em sua fase exponencial de crescimento, enquanto outros aderiram melhor em sua fase estacionária. Somente não definiram que

cepas se encaixavam nesses dois grupos, porque não era o objetivo principal do estudo.

O *Aa* também se adere às proteínas da matriz extracelular, de acordo com Mintz e Fives-Taylor (1999), como vários tipos de colágeno e fibronectina. Essa última foi a única proteína não colágena a que o *Aa* se aderiu, ao contrário do fibrinogênio e da proteína α 2-HS. Um dado interessante neste estudo é que o *Aa* se aderiu, em maior quantidade, ao colágeno tipo IV. Sabe-se que o colágeno tipo IV é encontrado em menor quantidade no tecido conjuntivo. Porém, apesar de ocorrer uma diminuição da quantidade de colágeno em inflamações crônicas do tecido gengival, pode-se concluir que há um aumento relativo na quantidade de colágeno tipo IV, talvez por manter sítios de adesão durante a progressão da doença. Essa adesão às proteínas da matriz sugere que o *Aa* pode aderir à fibronectina e agir como um sítio de nucleação para invasão de células epiteliais, e ao colágeno, agindo como um fator colonizador nos tecidos sub-epiteliais nos estágios avançados da doença. Além do mais, Meyer e Fives-Taylor (1994) relacionaram uma interação entre as vesículas do *Aa* com proteínas da matriz extracelular e verificaram que as mesmas podem facilitar a adesão às células epiteliais KB.

Lepine e colaboradores (1998) avaliaram a invasão de células epiteliais por várias cepas do *Aa*, utilizando o polimorfismo dos fragmentos de restrição (RLFP) para determinar em que grupo os isolados se classificariam e invadiriam as células KB. O RFLP grupo XIII foi caracterizado por cepas não leucotóxicas e foram encontradas somente em pacientes assintomáticos. Porém, dentro desse grupo, um dos isolados (UP54) foi caracterizado como uma cepa muito invasiva, se comparado com as cepas do mesmo grupo. Com esses resultados, pode-se sugerir que a invasão de células epiteliais não seja um fator de virulência decisivo como a leucotoxina, por exemplo. Brissete e Fives-Taylor (1999) também avaliaram a invasão de células epiteliais, porém sob um outro aspecto, ou seja, através de um mecanismo actino-dependente ou actino-independente. A cepa SUNY 465 cria halos de actina em torno delas mesmas, como reportado por Fives-Taylor, Meyer e Mintz (1996). Esses

halos não foram observados nas células controle. Já as cepas SUNY 523 e 4065 mostraram um aumento na eficiência de invasão quando na presença da cytochalasin D, um inibidor da movimentação da actina. Apesar desses resultados, a cepa SUNY 523 não mostrou um rearranjo da actina após a invasão, ao contrário da cepa SUNY 465, que, após invadir células KB, a actina moveu-se da periferia celular para um halo que envolve a bactéria.

Ao compararem os resultados, os autores usaram as mesmas cepas (SUNY 465 e SUNY 523). Lpine e colaboradores (1998) verificaram que a cepa SUNY 465 era, de longe, a mais invasiva, e que a cepa SUNY 523 também era invasiva, porém em uma escala menor. Isso sugere que a actina tenha um papel relevante na capacidade de invasão das células epiteliais.

Em relação às proteínas da membrana externa, Komatsuzawa e colaboradores (2002) verificaram que o padrão de migração da Omp 100 foi diferente, de acordo com as diferentes concentrações de gel. A massa molecular da Omp 100 foi calculada em 100 Kda gel 12%, 85 Kda gel 10% e 78 Kda gel 7,5%. Asakawa e colaboradores (2003) identificaram a Omp 100 pelo mesmo processo, porém não especificaram o padrão de migração nas diferentes concentrações de gel. Ambos os estudos não mencionaram no que implicaria o cálculo da massa molecular nessas diferentes concentrações, ou seja, se iria interferir na estrutura dessa proteína.

De acordo com Komatsuzawa e colaboradores (2002), a Omp 100 é homóloga a proteínas pertencentes a uma família de uma nova classe de adesinas, incluindo YaDA, UspA2, EibA-D e RCK. De acordo com os estudos, essas proteínas, assim como a Omp 100, também exibiram um padrão de migração na SDS-PAGE e mostraram alta massa molecular, sugerindo que elas formam oligômeros. Um aminoácido N-terminal da Omp 100 não mostrou nenhuma sequência semelhante com a da família das adesinas, que têm sido implicadas em adesão e invasão. Porém uma região C-terminal pode contribuir para a estrutura comum, expondo a região N-terminal para a superfície celular. As diferenças na região N-terminal entre espécies

podem revelar uma variedade de potenciais fatores de virulência.

Tabeta, Yoshie e Yamazaki (2001) verificaram que, apesar de os níveis de anticorpos para a proteína GroEL serem mais altos em pacientes periodontais, se comparados aos dos pacientes saudáveis, não houve diferença significativa entre eles. No entanto, não houve correlação entre os níveis de anticorpos e severidade de doença. Em contrapartida, Yoshioka e colaboradores (2004) realizaram um estudo mais específico e verificaram que o anti-soro reconhece tanto a fibronectina em sua forma primitiva quanto na forma desnaturada, porém não houve reação cruzada antigênica entre o colágeno tipo IV e o anticorpo anti-GroEL. A presença desses anticorpos parece inibir interações entre colágeno/fibronectina e células/fibronectina (ATTA; POWEL; TODD, 1994), um fenômeno que parece reduzir a integridade dos tecidos e afetar o reparo tecidual, prejudicado pela reação inflamatória.

Apesar de Tabeta, Yoshie e Yamazaki (2001) não direcionarem o anticorpo da proteína GroEL para uma estrutura específica do corpo, verificaram que tanto pacientes periodontalmente saudáveis quanto doentes apresentavam esse anticorpo. Portanto, mais estudos são necessários para determinar o porquê de a presença desse anticorpo afetar de alguma forma a integridade tecidual, o que caracterizaria um paciente periodontal, ou não afetar, o que caracterizaria um paciente saudável.

Ohguchi e colaboradores (2003) verificaram que o polissacarídeo capsular do *Aa* Y4 inibe a produção de IL-6 e IL-8 em fibroblastos gengivais de humanos, mas, pelo menos em monócitos, o efeito parece ser contrário. De acordo com Yamaguchi e colaboradores (1996), há um aumento na liberação de IL-6 além da IL-1 e TNF. Porém essa liberação é maior quando há uma estimulação pelo LPS, quando comparada com o antígeno específico para o polissacarídeo do sorotipo b. Yamaguchi e colaboradores (1998) sugeriram que o antígeno específico para o polissacarídeo do sorotipo b acaba por mascarar o LPS, evitando a opsonização pelas proteínas derivadas do sistema complemento e consequente fagocitose pelos leucócitos polimorfo-

nucleares. Ueda e colaboradores (1998) também notaram uma maior produção de IL-1 α , inclusive da prostaglandina E2, quando estimuladas pelo LPS da cepa Y4. No entanto, esse estudo foi direcionado para a formação de osteoclastos, que foi aumentada quando estimulada pelo LPS, só que em cultura de medula de ratos. Yamaguchi e colaboradores (1996) e Ohguchi e colaboradores (2003) utilizaram células de humanos.

O *Aa* secreta vesículas que são derivadas da membrana externa e que, de acordo com Demuth e colaboradores (2003), a cepa JP2 contém uma leucotoxina membranolítica que é tóxica para células HL60 de humanos. Kato, Kowashi e Demuth (2002) verificaram que essas vesículas possuem leucotoxinas biologicamente ativas, e sua atividade específica é de 4 a 5 vezes melhor que a da membrana externa e que, comparativamente, há mais leucotoxina enriquecida na cepa JP2 do que na cepa 652. Visto que essas vesículas parecem mediar a adesão da bactéria aos tecidos e estruturas do hospedeiro, os dados reportados até conferem com os resultados verificados por Mintz e Fives-Taylor (1999), onde, apesar de não se relacionar a união do *Aa* a proteínas da matriz extracelular com as vesículas secretadas pelo mesmo, a cepa 652 foi a que menos teve capacidade de se unir com essas proteínas, talvez por apresentar menos leucotoxicidade que as outras cepas. No entanto não se sabe se a leucotoxina é necessária para promover a interação com as vesículas derivadas da membrana externa com as células HL60. Demuth e colaboradores (2003) verificaram que a presença da leucotoxina não é tão importante, pois utilizaram uma cepa mutante com deficiência em leucotoxina, e tanto esta cepa quanto a não mutante interagiram rapidamente com as células HL60. Em face desses resultados, sugere-se que deve haver algum outro constituinte que pode intermediar essa associação inicial das vesículas com as células HL60, que até então não foram estudadas.

Ao verificar que a região promotora da leucotoxina apresenta uma deleção da 530-bp, Contreras et al (2000) consideraram que essas cepas são altamente leucotóxicas. Lepine e colaboradores (1998) verificaram ainda que as ce-

pas do RFLP grupo II (associado com doença periodontal) exibiram um amplicon 560-bp, e foram classificadas como grandes produtores de leucotoxina. Harazsthy e colaboradores (2000), apesar de não mencionarem as cepas, verificaram que o *Aa* foi encontrado apenas em indivíduos com periodontite juvenil localizada, ou periodontite de início precoce. Porém Contreras e colaboradores (2000), utilizaram as cepas ATCC 29522, ATCC 29523, ATCC 29524 e a JP2, conhecida por ter uma deleção da 530-bp, encontradas em indivíduos com diversos tipos de periodontite e inclusive pacientes saudáveis. Os autores mencionam ainda que as cepas leucotóxicas foram encontradas, na grande maioria, em adolescentes negros dos EUA ou da Jamaica. Esses resultados entram em contradição com os achados de Harazsthy e colaboradores (2000), nos quais o *Aa* altamente leucotóxico foi encontrado com mais frequência em hispânicos e, em seguida, em afro-americanos.

Mesmo promovendo apoptose da maioria das células T *in vitro*, Nalbant e Zadeh (2000) utilizaram cepas não produtoras de leucotoxina ou minimamente leucotóxicas, como as cepas ATCC 33384, NCTC 9710 e sorotipo C. Portanto, faltou, nesse estudo, a utilização de uma cepa mais leucotóxica, para verificar se há o mesmo efeito ou não sobre as células T, ou se ainda há algum outro fator que interfira na apoptose dessas células. No entanto, Fukunaga e Tsuruda (2001) utilizaram cepas menos virulentas, como a ATCC 29523 (sorotipo a) e NCTC 9710 (sorotipo c) e uma mais virulenta, a Y4 (sorotipo b). Nesse caso, pôde-se comparar o efeito sobre as células U937 (semelhantes aos macrófagos), que foram evidentemente mais afetadas pela cepa Y4. Em relação ao tempo de ação sobre as células humanas, os polimorfonucleares incubados com a leucotoxina sofreram, em apenas 3 minutos, um deslocamento dos grânulos do centro para a periferia da célula e, em 30 minutos, a concentração da enzima lactato-dehidrogenase chegava à sua máxima concentração extra-celular (JOHANSSON et al., 2000). Fukunaga e Tsuruda (2001) verificaram também que, em 30 minutos, a citotoxicidade do *Aa* já tinha efeito sobre as células U937. Já Nalbant e Zadeh

(2000) verificaram um aumento da anexina V, que identificaria células apoptóticas antes do tempo, em aproximadamente 48 horas. Apesar de os autores utilizarem metodologias diferentes, os resultados indicam o que está descrito na literatura, ou seja, que leucócitos polimorfonucleares e macrófagos (primeiras células de defesa) precisam de menos tempo para responder ao estímulo e tentar combater a infecção.

A toxina citoletal de expansão (cdt) do *Aa* é recentemente descrita como uma citotoxina com propriedades imunossupressoras. Sugai e colaboradores (1998) verificaram que, em 3 dias de incubação, foi observado um efeito citopático com expansão celular nas células HeLa tratadas. Em contrapartida, Fukunaga e Tsuruda (2001) observaram que o *Aa* não demonstrou nenhum efeito citopático nas células HeLa. Sugai e colaboradores (1998) notaram que algumas populações celulares apresentaram fragmentação nuclear com massas condensadas de cromatina, que é freqüentemente observada em células apoptóticas.

Belibasakis e colaboradores (2002) não observaram indução de apoptose ou lise celular, mas sim uma diminuição na síntese de DNA de células do ligamento periodontal e de fibroblastos em 6 horas de cultivo. Porém, também em 3 dias de incubação, foi observada expansão celular nas células-teste, se comparadas com as células-controle.

A maioria das células afetadas pela cdt, cujas toxinas exibem traços funcionais e estru-

turais de DNase (LARA-TEJERO; GALAN, 2002), apresentaram expansão celular, o que acaba causando alteração na síntese de DNA, principalmente impedindo o crescimento na fase G2/M com a subsequente inibição da proliferação celular. O turnover periodontal é caracterizado por um equilíbrio entre a proliferação e a degradação tecidual. Com esses resultados, uma inibição da proliferação celular iria causar um desequilíbrio e conseqüentemente, destruição periodontal.

Felizmente, de acordo com Tan, Song e Ong (2002), a freqüência do *Aa* expressando o genótipo cdt foi muito baixa, ou seja, em apenas 13% dos sítios estudados. Porém a grande maioria desses sítios foi encontrada em pacientes com periodontite agressiva. Isso não parece ser surpresa, pois pacientes diagnosticados com periodontite agressiva apresentam rápida destruição dos tecidos periodontais. A presença da cdt com propriedades imunossupressoras e citotóxicas pode contribuir para as características patológicas da periodontite agressiva, interferindo na defesa do hospedeiro.

CONCLUSÃO

Mais estudos deverão ser realizados para verificar se realmente esses fatores apresentam a mesma função *in vivo*, e talvez em que fase cada um deles interfere no processo da doença, para relacioná-los com os fatores do hospedeiro, conhecidos também por promover alterações nos tecidos periodontais.

The importance of A. actinomycetemcomitans virulence factors in the development of aggressive periodontal disease

Abstract

The periodontal disease is characterized by morphological changes in the supporting structures of the teeth and is caused by an interaction of bacterial subgroups and a susceptible subject. This interaction is necessary because the presence of periodontal pathogens can be frequently detected in healthy subjects. This indicates that not all subjects are equally susceptible and/or that there is a variation in virulence and potential pathogens. It is frequently believed that Gram-negative bacteria are involved in the initiation of inflammatory periodontal disease. One of the major microorganisms implicated in some forms of periodontal disease is Actinobacillus actinomycetemcomitans. Though the exact mechanism of the pathogenicity of A.

actinomycetemcomitans is not clear, a number of virulence factors have been characterized. These factors include: adhesion and invasion of epithelial cells, lipopolysaccharide, fibroblast-inhibitory factor, leukotoxin and polymorphonuclear leukocyte chemotaxis inhibitory factor.

Keywords: virulence factors; *A. actinomycetemcomitans*; periodontal disease.

REFERÊNCIAS

- ASAKAWA, R. et al. Outer membrane protein 100, a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.50, n.4, p.1125-1139, 2003.
- ATTA, M.S.; POWEL, R.J.; TODD, I. The influence of anti-fibronectin antibodies on interactions involving extracellular matrix components and cells: a possible pathogenic mechanism. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v.96, p.26-30, 1996.
- AVILA-CAMPOS, M.J. et al. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: other putative factors. **Pesq. Odontol. Bras.**, São Paulo, v.14, n.1, p.5-11, jan./mar. 2000.
- BELIBASAKIS, G. et al. Inhibited proliferation of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: involvement of cytolethal distending toxin. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v.110, p.366-373, 2002.
- BRISSETTE, C.A.; FIVES-TAYLOR, P.M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* may utilize either actin-dependent or actin-independent mechanisms of invasion. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.14, p.137-142, 1999.
- CALIFANO, J.F. et al. Influence of anti-*Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 (Serotype b) lipopolysaccharide on severity of generalized early-onset periodontitis. **Infect. Immun.**, Washington, DC, v.64, n.9, p.3908-3910, Sept. 1996.
- CONTRERAS, A. et al. Frequency of 530-bp deletion in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin promoter region. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.15, p.338-340, 2000.
- CORTELLI, S.C. et al. Detecção de cepas de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* de máxima e mínima leucotoxicidade em pacientes com doença periodontal. **Pesq. Odontol. Bras.**, São Paulo, v.17, n.2, p.183-188, abr./jun. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-74912003000200016&Ing...>. Acesso em : 28 mar. 2004.
- DE GRAEFF-MEEDER, E.R. et al. Antibodies to human hsp60 in patients with juvenile chronic arthritis, diabetes mellitus and cystic fibrosis. **Pediatr. Res.**, Hagerstown, v.34, p.424-428, 1993.
- DEMUTH, D.D. et al. Interaction of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* outer membrane vesicles with HL60 cells does not require leukotoxin. **Cell. Microbiol.**, Oxford, v.5, n.2, p.111-121, 2003.
- FIVES-TAYLOR, P.; MEYER, D.; MINTZ, K. Virulence factors of the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Periodontol.**, Chicago, v.67, p.291-297, 1996.
- FUKUNAGA, M.; TSURUDA, K. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* induces lethal effects on the macrophage-like human cell line U937. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.16, p.284-289, 2001.
- GASPARETTO, A.; ARANA-CHAVES, V.E.; AVILA-CAMPOS, M.J. Aderência de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* às células

- epiteliais bucais: estabilidade e aspectos ultra-estruturais. **Pesq. Odontol. Bras.**, São Paulo, v.14, n.4, p.311-318, out./dez. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-74912000000400002&Ing...>. Acesso em: 3 jul. 2003.
- GOULHEN, F. et al. Subcellular localization and cytotoxic activity of the GroEL-like protein isolated from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, Washington, DC, v.66, n.11, p.5307-5313, Nov. 1998.
- HARASZTHY, V.L. et al. Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v.71, n.6, p.912-922, June 2000.
- HARASZTHY, V.; ZAMBOM, J.J. Classificação bacteriana In: NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G. **Microbiologia oral e imunologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. cap.4, p.98-101.
- JOHANSSON, A. et al. Polymorphonuclear leukocyte degranulation induced by leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v.35, p.85-92, 2000.
- JORGE, A.O.C. Aspectos microbiológicos da doença periodontal. _____. **Microbiologia bucal**. 2.ed. São Paulo: Santos, 1998. cap.6, p.76-92.
- KAPLAN, J.B. et al. Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. **Infect. Immun.**, Washington, DC, v.69, n.9, p.5375-5384, Sept. 2001.
- KATO, S.; KOWASHI, Y.; DEMUTH, D.R. Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. **Microb. Pathog.**, London, v.32, p.1-13, 2002.
- KOMATSUZAWA, H. et al. Identification of six major proteins from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Gene**, Amsterdam, v.288, p.195-201, 2002.
- LARA-TEJERO, M.; GALAN, J.E. Cytolethal distending toxin: limited damaged as a strategy to modulate cellular functions. **Trends Microbiol.**, Cambridge, UK, v.10, p.147-152, 2002.
- LEPINE, G. et al. Epithelial cell invasion by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains from restriction fragment-length polymorphism groups associated with juvenile periodontitis or carrier status. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.13, p.341-347, Dec. 1998.
- LOTUFO, R.; PANNUTI, C. Recursos para o diagnóstico microbiológico em periodontia. In: OPPERMAN, R.V.; RÖSING, C.K. **Periodontia: ciência e clínica**. São Paulo: Artes Médicas, 2001. p.31-38.
- MEYER, D.H.; FIVES-TAYLOR, P.M. Characteristics of adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. **Infect. Immun.**, Washington, DC, v.62, p.928-935, 1994.
- MINTZ, K.P.; FIVES-TAYLOR, P.M. Binding of the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to extracellular proteins. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.14, p.109-116, 1999.
- NALBANT, A.; ZADEH, H.H. Evidence for apoptosis of the majority of T cells activated *in vitro* with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.15, p.290-298, 2000.
- NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G.; ZAMBOM, J.J. Doença periodontal. In: NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G. **Microbiologia oral e imunologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. cap.28, p.309-330.
- OHGUCHI, Y. et al. Capsular polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* inhibits IL-6 and IL-8 production in human fibroblast. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v.38, p.190-197, 2003.
- SAARELA, M. et al. Frequency and stability of mono- or poly-infection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, b, c, d or e.

- Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.7, p.277-279, 1992.
- SLOTS, J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. In: NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G. **Microbiologia oral e imunologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. cap.17, p.187-191.
- SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Microbiologia periodontal. In: LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N.P. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap.4, p.92-126.
- SUGAI, M. et al. The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytotoxic distending toxin. **Infect. Immun.**, Washington, DC, v.66, n.10, p.5008-5019, Oct. 1998.
- TABETA, K.; YOSHIE, H.; YAMAZAKI, K. Characterization of serum antibody to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* GroEL-like protein in periodontitis patients and healthy subjects. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.16, p.290-295, 2001.
- TAN, K.S.; SONG, K.P.; ONG, G. Cytotoxic distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: occurrence and association with periodontal disease. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v.37, p.268-272, 2002.
- UEDA, N. et al. Involvement of prostaglandin E2 and interleukin-1 α in the differentiation and survival of osteoclasts induced by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v.33, p.509-516, 1998.
- YAMAGUCHI, N. et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b-specific polysaccharide antigen stimulates production of chemotactic factors and inflammatory cytokines by human monocytes. **Infect. Immun.**, Washington, DC, v.64, n.7, p.2563-2570, July 1996.
- YAMAGUCHI, N. et al. Binding of the capsule-like serotype-specific polysaccharide antigen and the lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to human complement-derived opsonins. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.13, p.348-354, Jan. 1998.
- YOSHIOKA, M. et al. Antigenic cross-reactivity and sequence homology between *Actinobacillus actinomycetemcomitans* GroEL protein and human fibronectin. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.19, p.124-128, 2004.

Recebido em / Received: 08/06/2004

Aceito em / Accepted: 28/09/2004