DANIELA HIGASHI

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE ISOLADOS CLÍNICOS
DE *Porphyromonas gingivalis* EXPRESSOS
DIFERENCIALMENTE NA FORMAÇÃO DE BIOFILME,
USANDO DIFFERENTIAL DISPLAY PCR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Microbiológicas do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Regina L. Simionato

São Paulo

2008

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

© reprodução total

Higashi, Daniela. Identificação de genes de isolados clínicos de *Porphyromonas gingivalis* expressos diferencialmente na formação de biofilme, usando Differential Display PCR / Daniela Higashi. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Maria Regina Lorenzetti Simionato.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Microbiologia Oral.

Versão do título para o inglês: Identification of genes from *Porphyromonas gingivalis* differentially expressed in biofilm formation, using Differential Display PCR.

Descritores: 1. *Porphyromonas gingivalis* 2. DD PCR 3. Expressão de genes 4. Biofilmes I. Simionato, Maria Regina Lorenzetti II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

ICB/SBIB209/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Daniela Higashi.

Título da Dissertação: Identificação de genes de isolados clínicos de
Porphyromonas gingivalis expressos diferencialmente na
formação de biofilme, usando Differential Display PCR .
Orientador(a): Maria Regina Lorenzetti Simionato.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

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

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 38130900 - telefax: (55) (011) 3818-7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

Decl. CEP SH.076/2006

DECLARAÇÃO

Em adendo ao parecer 643/CEP, informo que a pesquisadora DANIELA HIGASHI é a responsável pelo Projeto: *"Identificação de genes de isolados clínicos de Porphyromonas gingivalis expressos na formação de biofilme, usando diferencial display PCR"* sob a orientação da Profa. Dr. Maria Regina L. Simionato.

São Paulo, 15 de setembro de 2006

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO

Vice-Coordenador da CEP SH-ICB/USP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

DECLARAÇÃO

Parecer 643/CEP-ICB/USP

Informamos a Vossa Senhoria, que diante de Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, estamos cientes da aprovação do projeto de pesquisa intitulado "Identificação de genes de isolados clínicos de *Porphyromonas gingivalis* expressos na formação de biofilme, usando Differential Display PCR" de sua autoria, não havendo nenhuma oposição por parte deste CEP, com relação a sua realização.

Sendo o que se nos apresentava, valemo-nos da oportunidade para reiterar-lhe os nossos protestos de elevada estima e distinta consideração.

São Paulo, 09 de novembro de 2007.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador

Aos meu pais, Dilson e Alice,
pelo apoio constante e por acreditarem
que eu sou capaz.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por todos os créditos, incentivos e apoio incondicional em todas as minhas escolhas. Pelo amor e carinho. Pelos ensinamentos e exemplos. O que tenho, devo a eles. O que eu sou me espelhei neles.

Aos meus irmãos, Denise e Danilo pela convivência, e por compartilharem muitas emoções. Um sanduíche completo e perfeito.

Ao Fábio pelo amor e companheirismo. Pela compreensão, apoio e incentivo em todos os momentos dessa jornada.

Aos amigos que me incentivaram nessa caminhada e entenderam a minha ausência. Mesmo distante permanecem no coração.

À minha querida avó Kazuko, por todos os cuidados e amor dispensados durante tantos anos. Saudades.

Às minhas tias Luzia e Shisuco pelo acolhimento e carinho, minhas segunda mãe.

Aos meus queridos primos-irmãos Mara, Kátia, Anderson e Luciana por me receberem de braços abertos e sempre fazerem eu me sentir em casa.

Aos pequenos Thamires, Whilker e Luana por todos os momentos de alegria e diversão.

À minha tia Mako pelo incentivo.

A todos os tios e primos que torceram por mim.

À Prof^a. Maria Regina Simionato por me receber e aceitar em seu laboratório antes mesmo de me conhecer. Obrigada por acreditar e confiar na minha capacidade. Obrigada por todos os ensinamentos e experiência.

Às colegas de laboratório Graziela, Luciana Kfour, Ingrid, Livia, Sara, Érica, Luciana Espejo e Camila pela convivência.

À Graziela e Luciana Kfour pela amizade e ajuda nos momentos de aperto.

À Prof^a Márcia Mayer por sempre deixar as portas do seu laboratório abertas e permitir a minha presença, sem restrições.

Aos alunos do laboratório da Prof^a Márcia Mayer por sempre me receberem muito bem, e principalmente à Adriana, Ana Carla, Dione, Ellen, Ericka, Flávia, Josely, Priscila e Sílvia pelos conselhos e pela disposição em me ajudar.

Às Prof^a Elisabete José Vicente e Ana Clara Schenberg e aos alunos do Laboratório de Genética por permitirem o uso do aparelho de Real Time PCR.

Aos técnicos João Paulo e Léo pela ajuda no laboratório e pela constante disposição em ajudar.

À Prof^a Maria Aparecida de Cerqueira Luz e ao Departamento de Dentística e à Disciplina de Periodontia da FOUSP pela permissão das coletas lá realizadas.

À todos os professores e funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo que tanto contribuíram para a minha formação.

À secretária Alice Shimabuku pela paciência e compreensão nos momentos difíceis.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste projeto (05/04064-7).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa disponibilizada durante a realização desse trabalho.

O sucesso não se encontra no final do caminho.

Ele está na própria jornada.

François Garagnon

RESUMO

HIGASHI, D. **Identificação de genes de isolados clínicos de *Porphyromonas gingivalis* expressos diferencialmente na formação de biofilme, usando Differential Display PCR**. 2008. 81f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Porphyromonas gingivalis é um bacilo anaeróbio Gram negativo envolvido com o início e progressão de formas severas de doenças periodontais. Embora numerosos estudos demonstrem uma íntima associação de *P. gingivalis* com as doenças periodontais, esta relação não está totalmente entendida. O isolamento e detecção de *P. gingivalis* em sítios saudáveis, bem como a presença desta bactéria em proporções similares em bolsas periodontais progressivas ou inalteradas, pode ser um indicativo de subpopulações com diferentes potenciais de virulência. *P. gingivalis* é um colonizador tardio ou secundário do biofilme oral e adere preferencialmente a células de *Streptococcus gordonii*, um colonizador inicial do biofilme dental. Uma vez estabelecida em biofilme, a bactéria pode apresentar características fenotípicas distintas da forma planctônica. Cada uma das etapas de formação do biofilme representa desafios únicos para as células bacterianas, que respondem exibindo uma expressão organizada de um discreto conjunto de genes. Assim este estudo se propôs a comparar a expressão de genes de amostras de *P. gingivalis* isoladas de diferentes condições periodontais usando Differential Display (DD) Reverse Transcription PCR, em biofilme misto com *S. gordonii*. Amostras de RNA de *P. gingivalis* foram submetidas à Transcrição Reversa e o perfil de expressão gênica de células em biofilme (saúde e periodontite) foi comparado com o de células planctônicas pareadas. Após eletroforese em gel de agarose, bandas diferencialmente expressas nas diferentes condições foram clonadas, seqüenciadas e os genes identificados em bancos de dados, revelando perfil distinto na expressão de genes nas condições comparadas. A confirmação da expressão diferencial dos genes detectados foi realizada através da técnica de PCR em Tempo Real. Desses genes, há alguns relacionados com fatores de virulência, outros com obtenção de energia além de genes relacionados com proteínas de membrana e de transporte.

Palavras-chave: *Porphyromonas gingivalis*, expressão de genes, DD PCR, biofilmes.

ABSTRACT

HIGASHI, D. **Identification of genes from *Porphyromonas gingivalis* isolates differentially expressed in biofilm formation using Differential Display PCR.** 2008. 81f. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Porphyromonas gingivalis is a Gram negative anaerobic rod involved with the beginning and progression of severe forms of periodontal diseases. Although several studies have demonstrated a close association of *P. gingivalis* with periodontal diseases, this relationship is not clearly understood. The isolation and detection of *P. gingivalis* in health sites in addition to the presence of this specie at almost similar proportions in progressive or unaltered pocket depth could be an indication of subpopulations with different virulence potential. *P. gingivalis* is a late or secondary colonizer of oral biofilms and adhere mainly to cells of *Streptococcus gordonii*, an early colonizer of dental plaque. Once established in a biofilm, bacteria may present phenotypical features distinct from their planktonic partners. Each one of the steps of biofilm formation represents unique challenges to bacterial cells, which react with an organized expression of a discrete set of genes. Therefore, this study aim to compare the gene expression of *P. gingivalis* strains isolated from different periodontal conditions using Differential Display (DD) Reverse Transcription PCR, in a mixed biofilm with *S. gordonii*. Reverse transcription was performed with RNA samples and the pattern of gene expression was determined with biofilm cells (health and disease) and also with their planktonic samples partners. After electrophoresis agarose gel, bands differentially expressed were cloned, sequenciated and analyzed in gene data bank, showing distinct gene expression profile of compared samples. Differential expression was confirmed by Real Time PCR. Some of the confirmed genes are related to virulence factors, energy metabolism and transport and membrane proteins.

Key words: *Porphyromonas gingivalis*, gene expression, DD PCR, biofilms.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Análise comparativa das médias de formação de biofilme misto entre *S. gordonii* e amostras clínicas de *P. gingivalis* (periodontite e saudável) por OD₅₄₀.
 p valor = 0,176.....45
- Figura 2. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF5 e DDR6 foram submetidos à eletroforese, evidenciando bandas expressas diferencialmente entre amostras de Biofilme de Saudável (BS) e Biofilme de Periodontite (BP).....46
- Figura 3. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF6 e DDR9 foram submetidos à eletroforese, evidenciando bandas expressas diferencialmente entre amostras de Biofilme de Saudável (BS) e Biofilme de Periodontite (BP).....46
- Figura 4. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF7 e DDR6 foram submetidos à eletroforese, evidenciando bandas expressas diferencialmente entre amostras de Biofilme de Saudável (BS) e Biofilme de Periodontite (BP).....47
- Figura 5. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF7 e DDR9 foram submetidos à eletroforese, evidenciando bandas expressas diferencialmente entre amostras de Biofilme de Saudável (BS) e Biofilme de Periodontite (BP).....47
- Figura 6. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF5 e DDR6 foram submetidos à eletroforese, evidenciando banda expressa diferencialmente entre amostras de Biofilme de Saudável (BS) e Planctônico de Saudável (PS).....48

- Figura 7. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF6 e DDR9 foram submetidos à eletroforese, evidenciando bandas expressas diferencialmente entre amostras de Biofilme de Saudável (BS) e Planctônico de Saudável (PS).....48
- Figura 8. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF7 e DDR6 foram submetidos à eletroforese, sem evidências de bandas expressas diferencialmente entre amostras de Biofilme de Saudável (BS) e Planctônico de Saudável (PS).....49
- Figura 9. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF7 e DDR9 foram submetidos à eletroforese, evidenciando bandas expressas diferencialmente entre amostras de Biofilme de Saudável (BS) e Planctônico de Saudável (PS).....49
- Figura 10. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF5 e DDR6 foram submetidos à eletroforese, sem evidências de bandas expressas diferencialmente entre amostras de Biofilme de Periodontite (BP) e Planctônico de Periodontite (PP).....50
- Figura 11. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF6 e DDR9 foram submetidos à eletroforese, evidenciando bandas expressas diferencialmente entre amostras de Biofilme de Periodontite (BP) e Planctônico de Periodontite (PP).....50
- Figura 12. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF7 e DDR6 foram submetidos à eletroforese, evidenciando bandas expressas diferencialmente entre amostras de Biofilme de Periodontite (BP) e Planctônico de Periodontite (PP).....51
- Figura 13. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF7 e DDR9 foram submetidos à eletroforese, sem evidências de bandas expressas diferencialmente entre amostras de Biofilme de Periodontite (BP) e Planctônico de Periodontite (PP).....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores espécie-específicos de <i>P. gingivalis</i> 16SrRNA utilizados para identificação das amostras clínicas isoladas de pacientes com periodontite e com o periodonto saudável.....	34
Tabela 2: Iniciadores para RT identificados como DDF e iniciadores para DD PCR identificados como DDR, descritos por Fislage et al. (1997).....	38
Tabela 3: Genes de <i>P. gingivalis</i> e iniciadores específicos para cada gene desenhados a partir do site www.genscript.com para confirmação dos resultados do DD PCR por PCR em Tempo Real.....	41
Tabela 4. Valores médio da formação de biofilme simples de <i>S. gordonii</i> e biofilme de amostras padrão de <i>P. gingivalis</i>	43
Tabela 5. Valores da média de formação de biofilme misto entre <i>S. gordonii</i> e amostras clínicas de <i>P. gingivalis</i> isoladas de pacientes com periodontite.....	44
Tabela 6. Valores da média de formação de biofilme misto entre <i>S. gordonii</i> e amostras clínicas de <i>P. gingivalis</i> isoladas de pacientes com periodonto saudável.....	44
Tabela 7. Lista de genes expressos diferencialmente, com seus respectivos nomes, siglas e funções, além da banda e comparação na qual foram encontrados. Em se tratando de proteínas hipotéticas, suas seqüências foram comparadas com seqüências de proteínas conhecidas de outras bactérias e sua função foi reportada para a tabela. Biofilme saúde (BS); biofilme periodontite (BP); planctônico saúde (PS); planctônico periodontite (PP); XX – amostra na qual o gene foi expresso positivamente.....	52
Tabela 8. Expressão relativa de PG 0069 Proteína hipotética (açúcar quinase), através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).....	53
Tabela 9. Expressão relativa de PG 0069 Proteína hipotética (açúcar quinase), através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e periodontite (BP).	53

Tabela 10. Expressão relativa de PG 0069 Proteína hipotética (açúcar quinase), através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).	53
Tabela 11. Expressão relativa de PG 0076 <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanina, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).	53
Tabela 12. Expressão relativa de PG 0076 <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanina, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e periodontite (BP).	53
Tabela 13. Expressão relativa de PG 0076 <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanina, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).....	54
Tabela 14. Expressão relativa de PG 0118 Glicosiltransferase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).	54
Tabela 15. Expressão relativa de PG 0118 Glicosiltransferase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e biofilme de periodontite (BP).	54
Tabela 16. Expressão relativa de PG 0118 Glicosiltransferase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).	54
Tabela 17. Expressão relativa de PG 0187 <i>ISPg6</i> , através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).....	54
Tabela 18. Expressão relativa de PG 0187 <i>ISPg6</i> , através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e biofilme de periodontite (BP)...	54
Tabela 19. Expressão relativa de PG 0187 <i>ISPg6</i> , através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).....	55

Tabela 20. Expressão relativa de PG 0598 Proteína hipotética, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).	55
Tabela 21. Expressão relativa de PG 0598 Proteína hipotética, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e biofilme de periodontite (BP).	55
Tabela 22. Expressão relativa de PG 0598 Proteína hipotética, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).	55
Tabela 23. Expressão relativa de PG 1118 Proteína ClpB, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).	55
Tabela 24. Expressão relativa de PG 1118 Proteína ClpB, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e biofilme de periodontite (BP).	55
Tabela 25. Expressão relativa de PG 1118 Proteína ClpB, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).	55
Tabela 26. Expressão relativa de PG 1321 Formato tetrahidrofolato ligase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).	56
Tabela 27. Expressão relativa de PG 1321 Formato tetrahidrofolato ligase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e biofilme de periodontite (BP).	56
Tabela 28. Expressão relativa de PG 1321 Formato tetrahidrofolato ligase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).	56
Tabela 29. Expressão relativa de PG 1367 Proteína hipotética (permease de membrana), através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).	56

Tabela 30. Expressão relativa de PG 1367 Proteína hipotética, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e biofilme de periodontite (BP).	56
Tabela 31. Expressão relativa de PG 1367 Proteína hipotética, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).	56
Tabela 32. Expressão relativa de PG 1372 proteína hipotética, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).....	57
Tabela 33. Expressão relativa de PG 1372 proteína hipotética (proteína de exportação), através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e biofilme de periodontite (BP).	57
Tabela 34. Expressão relativa de PG 1372 proteína hipotética (proteína de exportação), através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).	57
Tabela 35. Expressão relativa de PG 1580 Proteína hipotética (fator de von Willebrand), através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).	57
Tabela 36. Expressão relativa de PG 1580 Proteína hipotética (fator de von Willebrand), através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e biofilme de periodontite (BP).	57
Tabela 37. Expressão relativa de PG 1580 Proteína hipotética (fator de von Willebrand), através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).....	57
Tabela 38. Expressão relativa de PG 1748 Transcetolase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).....	58
Tabela 39. Expressão relativa de PG 1748 Transcetolase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e biofilme de periodontite (BP).	58

Tabela 40. Expressão relativa de PG 1748 Transcetolase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).	58
Tabela 41. Expressão relativa de PG 2003 Desoxiguanosina trifosfato trifosfohidrolase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).	58
Tabela 42. Expressão relativa de PG 2003 Desoxiguanosina trifosfato trifosfohidrolase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e biofilme de periodontite (BP).	58
Tabela 43. Expressão relativa de PG 2003 Desoxiguanosina trifosfato trifosfohidrolase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).	58

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reação da polimerase em cadeia
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
k-Da	kilo Dalton
IL	Interleucinas
LPS	Lipopolissacarídeo
CRP	Proteína C reativa
PGE2	Prostaglandina E 2
TNF- α	Tumor de necrose tumoral alfa
EM	Esclerose Múltipla
FimA	Fímbria maior de <i>P. gingivalis</i>
Mfa1	Fímbria menor de <i>P. gingivalis</i>
SspB	Proteína adesina de <i>S. gordonii</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
%	Porcentagem
DD PCR	Differential display PCR
RT	Transcrição reversa
RNA	Ácido ribonucléico
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
NaCl	Cloreto de sódio
VMGA III	Viability medium, Gottemberg, anaerobically
°C	Grau Celsius
min	minutos
μ g	micrograma
ml	mililitro
N ₂	Nitrogênio gasoso
CO ₂	Gás carbônico
H ₂	Hidrogênio gasoso
TSB	Tryptic Soy Broth (Caldo trípico de soja)
ng	nanograma
rRNA	Ácido ribonucléico ribossômico
pb	pares de base
A	Adenina
T	Timina
G	Guanina
C	Citosina
h	hora
rpm	Rotações por minuto
OD	Densidade ótica
ufc	Unidades formadoras de colônia

μl	microlitro
PBS	Phosphate buffered saline (tampão fosfato salina)
nm	nanômetro
pmol	picomolar
mM	milimolar
dNTP	Desoxiribonucleotídios trifosfato
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
V	Volts
TAE	Tampão Tris Acetato EDTA
3'	terminação 3 linha
dATP	Desoxiadeninosina trifosfato
TE	Tampão Tris EDTA
M	molar
Ct	Threshold cycle
BS	Biofilme de saudável
BP	Biofilme de periodontite
PS	Planctônico de saudável
PP	Planctônico de periodontite
HSP	Heat Shock protein (proteína de choque térmico)
ATPase	Enzima degradadora de ATP
ATP	Adenosina trifosfato
UspA	Universal stress protein A (proteína de estresse universal A)
ADP	Adenosina difosfato
PAI	Pathogenicity island (ilhas de patogenicidade)
tRNA	Ácido ribonucleico transportador
IS	Insertion element (elemento de inserção)
H ₄ F	Tetrahidrofolato
Glicose-6-P	Glicose-6-fosfato
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato
H ₂ O	Molécula da água
Ribulose-5-P	Ribulose-5-fosfato
NADPH	Dihidronicotinamida adenina dinucleotídio fosfato
TKT	Transcetolase
O ₂	Oxigênio gasoso
PG	Peptidoglicano
AM	<i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanina amidases
dGTPase	Desoxiguanosina trifosfato trifosfohidrolase
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
vWf	Fator de von Willebrand
GT	Glicosiltransferase
TH	Transhidrogenase

LISTA DE ANEXO

Anexo 1: Termo de consentimento Livre e esclarecido utilizado para coleta de amostra de pacientes com periodontite e com periodonto saudável.....	79
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	OBJETIVOS	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1	Coleta das amostras clínicas.....	33
3.2	Identificação e seleção das amostras clínicas para formação de biofilme. misto	34
3.3	Condição experimental da formação de biofilme para avaliação da expressão por DD PCR	35
3.4	Isolamento de RNA	36
3.5	DD PCR	
3.5.1	Transcrição reversa (RT)	37
3.5.2	Amplificação do cDNA para DD PCR	38
3.5.3	Caracterização dos produtos expressos diferencialmente	38
3.5.4	Isolamento e adição de adenina nos produtos do DD PCR	39
3.5.5	Clonagem e sequenciamento dos produtos do DD PCR	39
3.6	Confirmação por PCR em Tempo Real.....	40
4	RESULTADOS.....	43
5	DISCUSSÃO.....	59
6	CONCLUSÕES.....	69
	REFERÊNCIAS.....	70
	ANEXO.....	79

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma doença inflamatória crônica destrutiva que ocorre como resultado de ações complexas de bactérias periodontais (AMANO, 2003). Loe; Theilade; Jensen (1965) comprovaram, através da supressão da higiene oral, o desenvolvimento da gengivite em indivíduos com o periodonto saudável, após 21 dias de acúmulo de biofilme sobre a superfície dos dentes. A inflamação gengival pode ser associada com um acúmulo não específico de biofilme dental, porém a perda de inserção e destruição óssea, consideradas marcadores da doença periodontal, são associadas a um número reduzido de bactérias (ZAMBON, 1996).

Cerca de 300 espécies bacterianas têm sido identificadas em amostras de bolsa periodontal, porém a relação com a etiologia e progressão das doenças periodontais é complexa. Muitas dessas espécies também estão presentes em indivíduos com periodonto saudável, mantendo uma relação harmoniosa com o hospedeiro (LAMONT; JENKINSON, 1998). Espécies como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* são consideradas periodontopatógenos (HAFFAJEE; SOCRANSKY, 1994).

Essas espécies são capazes de produzir toxinas que agridem os tecidos periodontais e induzem o sistema imunológico hospedeiro, promovendo a destruição periodontal (TAKEUCHI et al., 2001). A presença de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* parece variar com a etnia, sugerindo que a composição da microbiota é dependente de fatores genéticos e ambientais (SLOTS; TING, 1999). Parece que *P. gingivalis*, atuando sozinho ou em infecções mistas, pode ter um papel fundamental na atividade da doença (HAFFAJEE; SOCRANSKY, 1994).

Tanner et al. (1998) e Ximénez-Fyvie et al. (2000) encontraram pequena diferença na qualidade da microbiota de indivíduos com periodonto saudável, de gengivite e de periodontite inicial, confirmando estudos de Dzink; Socransky; Haffajee (1988) que demonstraram, através de cultura, a presença de periodontopatógenos em indivíduos com o periodonto saudável. Através da técnica de DNA-DNA checkerboard, Haffajee et al. (1998) concluíram que *P. gingivalis*, *T. forsythia*,

Treponema denticola e *Selenomonas noxia* são detectados em maior nível em pacientes com doença periodontal do que em pacientes saudáveis ou em manutenção, sugerindo que a presença dessas bactérias possui um papel no início e/ou na progressão da doença. A frequência de detecção por reação da polimerase em cadeia (PCR) de *P. gingivalis* e *T. forsythia* aumentou proporcionalmente com o aumento da profundidade da bolsa periodontal (KLEIN; GONÇALVES, 2003).

Estudos de van Winkelhoff et al. (2002), através de PCR, encontraram similaridades na detecção de *P. gingivalis* entre pacientes com periodontite e saudáveis e afirmaram que a presença da bactéria é fundamental para a patogênese da doença periodontal, mas não é suficiente para o início dela. *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, bactérias pertencentes ao complexo vermelho (SOCRANSKY et al., 1998), juntas ou separadamente aumentam o risco para a progressão da doença periodontal. Takeuchi et al. (2001) revelam que a presença concomitante dessas espécies e sua co-agregação demonstram a relação simbiótica entre elas.

A microbiota de pacientes com periodontite refratária é semelhante aquela encontrada em pacientes com periodontite que não foram submetidos ao tratamento periodontal (SOCRANSKY et al., 2002) e espécies como *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *A. actinomycetemcomitans* foram detectadas mesmo após terapia mecânica (MOMBELLI et al, 2000). A manutenção da terapia mecânica bem sucedida é importante, pois o biofilme supragengival pode servir como reservatório para a recolonização de sítios tratados (XIMÉNEZ-FYVIE et al., 2000), apesar de Yilmaz (2008) afirmar que *P. gingivalis* além da capacidade invasiva, consegue se multiplicar e persistir no interior de células epiteliais, o que pode contribuir para episódios de recolonização.

P. gingivalis possui inúmeros fatores de virulência que podem contribuir para a progressão e severidade da doença: Fímbrias medeiam a adesão de *P. gingivalis* com células epiteliais, fibroblastos e colonizadores iniciais do biofilme dental e também induzem a quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) (LAMONT; JENKINSON, 1998). Em estudo com ratos, a fímbria de 67-kDa foi capaz de induzir a liberação de citocinas inflamatórias, as quais estão relacionadas com destruição do tecido conjuntivo, remodelação e reabsorção ósseas (HAMADA et al., 2002).

Hiramine et al. (2003) comprovaram este achado introduzindo mutantes deficientes da fímbria de 67-kDa e verificaram redução da perda óssea em ratos.

A aquisição de nutrientes é fundamental para a sobrevivência da bactéria, é realizada por proteases que degradam componentes dos tecidos do hospedeiro, como colágeno, fibronectina, queratina etc, podendo contribuir para a perda de inserção, além de facilitar a invasão do tecido epitelial e conjuntivo. (KATZ et al., 2002) Essas proteases podem modular a resposta do sistema imune do hospedeiro, induzindo ou reprimindo. Essa dualidade por um lado leva à atração de PMNs e interleucinas (IL) ao sítio infectado, posteriormente esses PMNs são lisados e suas enzimas líticas degradam o próprio tecido hospedeiro, fornecendo nutrientes para a bactéria, mas danificando os tecidos de suporte. Pelo outro lado, a bactéria tem a capacidade de reprimir o sistema imune, principalmente nos estágios iniciais da infecção, provavelmente para facilitar sua multiplicação ou mais tardiamente, destruindo os componentes do sistema imune nato e inato. O lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa de *P. gingivalis* também representa um mecanismo de virulência por ser capaz de ativar células do sistema complemento, e também ativar diferentes tipos celulares (fibroblastos, monócitos/ macrófagos) a liberar de citocinas inflamatórias (LAMONT; JENKINSON, 1998).

A necessidade de hemina para o metabolismo de *P. gingivalis* é um fator limitante para o seu crescimento e também contribui para a regulação de fatores de virulência (GENCO et al., 1995). Muitos componentes do hospedeiro, como hemoglobina, haptoglobina, albumina entre outros contém hemina e a bactéria é capaz de degradá-las para conseguir hemina. Acredita-se que em sítios periodontais inflamados, resultando em sangramento gengival, a concentração de hemina é elevada e isto pode ser um fator predisponente para o acúmulo de *P. gingivalis* nesses sítios. Somado a isso, sabe-se que a fibrina e fibrinogênio são fatores essenciais para a formação do coágulo sangüíneo (LAMONT; JENKINSON, 1998). Gingipaínas K e R de *P. gingivalis* são fatores fibrinogenolíticos, podendo contribuir para o aumento do tempo de sangramento, o que demonstra a relação das proteases e conseqüentemente de *P. gingivalis* com a tendência ao sangramento em sítios periodontais inflamados (IMAMURA et al., 1995).

A doença periodontal tem importância médica pela sua associação com algumas doenças sistêmicas. Dentre as enfermidades sistêmicas crônicas relevantes uma de grande importância é doença coronariana. Há relatos de que *P. gingivalis* presentes em sítios inflamados da cavidade bucal podem penetrar na corrente sanguínea através de atos simples, como mastigar ou falar, e principalmente durante a escovação, levando à bacteremia transitória. Esses periodontopatógenos presentes na corrente sanguínea são capazes de invadir células endoteliais, mediada por fímbria maior (DESHPANDE; KHAN; GENCO, 1998) ou induzir agregação plaquetária, considerada um dos marcadores para a formação do ateroma da doença cardiovascular (KURAMITSU; KANG; QI, 2003).

A proliferação celular e o caráter inflamatório da lesão ateromatosa podem ser devidos a componentes microbianos (LIBBY, 1996). Assim, tem sido demonstrado que quanto maior a concentração no plasma da proteína C-reativa (CRP), um marcador para inflamação sistêmica, mais alta a incidência de infarto do miocárdio ou infarto isquêmico (RIDKER et al. 1997). Desde que nas doenças periodontais o processo inflamatório é intenso, é possível que patógenos periodontais possam estar envolvidos no aumento de CRP como fonte de inflamação crônica. De fato, a presença de patógenos periodontais como *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *C. rectus* e *T. forsythia* em amostras subgengivais é associada positivamente com aumento de níveis séricos elevados de CRP (NOACK et al., 2001), fibrinogênio e contagem de células brancas. Pacientes periodontais possuem um risco 9,5 vezes maior de desenvolver doenças coronarianas, independente dos outros fatores de risco tradicionais, do que pacientes com periodonto saudável (ABOU-RAYA et al., 2002).

Dasanayake et al. (2001) associaram o nascimento de bebês prematuros de baixo peso com o perfil de higiene oral da mãe. Relatam que a justificativa pra esse fato se deve aos níveis de prostaglandina E2 (PGE2) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) aumentarem lentamente durante a gravidez até atingirem um limite que induz o trabalho de parto, dilatação e nascimento. Essas moléculas também são produzidas durante a infecção periodontal e se cruzarem a barreira placentária podem induzir o parto prematuro. *P. gingivalis* também pode estar envolvida na patogênese de doenças crônicas auto-imunes, como a Esclerose Múltipla (EM), pois a bactéria é

capaz de estimular células gliais a secretarem mediadores inflamatórios. Estudo com animais indicam que aqueles portadores da EM infectados com *P. gingivalis* têm a doença agravada (SHAPIRA; AYALON; BRENNER, 2002).

Em 1978, Slots; Gibbons, em estudo realizado *in vivo*, verificaram que *Bacteroides melaninogenicus* subsp. *asaccharolyticus* (atualmente *P. gingivalis*) preferencialmente coloniza ambientes previamente colonizados por Gram positivos como estreptococos e actinomicetes. Posteriormente essa afirmação foi comprovada e os gram positivos citados por eles foram denominados colonizadores primários do biofilme dental (LI et al., 2004). Os autores relatam que a presença dos colonizadores primários é de fundamental importância, pois após sua adesão à superfície dos dentes eles fornecem substratos para colonizadores subseqüentes, influenciando os estágios de sucessão bacteriana.

P. gingivalis adere a diferentes microrganismos e através de diferentes mecanismos. A adesão com *Capnocytophaga ochracea* e *Eubacterium saburreum* se dá através de vesículas extracelulares (GRENIER; MAYRAND, 1987), com *F. nucleatum* ocorre através de proteína adesina com seu receptor carboidrato em *P. gingivalis*, sendo específica e possibilitando, portanto, a colonização de sítios supra e sub-gengivais pelas espécies (KINDER; HOLT, 1989). As fímbrias e vesículas de *P. gingivalis* podem aderir a *Actinomyces viscosus* (GOULBOURNE; ELLEN, 1991). Com *T. denticola* a interação é altamente específica e bimodal, sendo um dos mecanismos termo sensível e o outro termo estável (GRENIER, 1992). Nakao; Senpuku; Watanabe (2006) afirmaram que a síntese do antígeno-O LPS, promove a exposição de receptores de membrana envolvidos na adesão à superfícies sólidas e outros microrganismos e que o mesmo gene responsável pela síntese do antígeno-O está envolvido no aumento da formação de biofilme. Em estudo de Lin; Wu; Xie (2006) os autores concluíram que a fímbria maior de *P. gingivalis* está envolvida na adesão e início da colonização, enquanto a menor está envolvida na formação de microcolônias e maturação do biofilme.

Um dos mais importantes mecanismos de colonização oral por *P. gingivalis* ocorre através da co-agregação com *Streptococcus gordonii*, um colonizador inicial do biofilme dental. *P. gingivalis* adere à camada de *S. gordonii* previamente aderida a

superfícies sólidas, formando estruturas em forma de torres (COOK; COSTERTON; LAMONT, 1998). A adesão entre eles é complexa e se dá de forma multimodal, envolvendo a fímbria maior (FimA) e a fímbria menor (Mfa1) de *P. gingivalis*. Nessa interação, FimA adere ao gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) presente na superfície de *S. gordonii*, enquanto Mfa1 adere à proteína SspB, uma família de proteínas de superfície altamente conservadas nos estreptococos orais. A primeira interação (FimA x GAPDH) é estabilizada pela segunda (Mfa1 x SspB) e esta é necessária para uma ótima adesão entre as espécies (LAMONT; HSIAO; GIL, 1994; CHUNG; DEMUTH; LAMONT, 2000; MAEDA et al., 2004; PARK et al., 2005). Inicialmente interações de longa distância seriam mediadas pela fímbria maior facilitando a localização de *P. gingivalis* e *S. gordonii*. Posteriormente a co adesão mediada por Mfa1-SspB e FimA-GAPDH ocorreria. A interação Mfa1 com SspB desencadearia uma cascata de reações culminando com a formação do biofilme. A transformação para um estado “biofilme preparado” permite a expressão de receptores de superfície que permitem a autoagregação de *P. gingivalis* e estimula outras células de *P. gingivalis* a expressarem o mesmo receptor. Alternativamente ou adicionalmente, *P. gingivalis* liberaria moléculas sinalizadoras solúveis no meio, induzindo a adesão de outras células à superfícies sólidas (LAMONT et al., 2002).

A maioria dos microrganismos na natureza é encontrada aderida a superfícies, crescendo na forma de biofilme. A formação do biofilme se inicia quando a bactéria se aproxima de uma superfície tão proximamente que a sua motilidade diminui e ocorre uma associação transitória entre a bactéria e a superfície ou a bactérias previamente aderidas. Essa associação transitória permite que a bactéria escolha um local adequado para permanecer. A partir do momento no qual a bactéria encontra um membro da microcolônia estável para se associar, pode-se afirmar que ela escolheu seu vizinho para a vida, essa escolha se dá de forma a proporcionar à bactéria vantagens nutricionais e trocas simbióticas. Posteriormente os biofilmes se desenvolvem de forma tridimensional, como edifícios, mas um membro pode se destacar e voltar ao estilo de vida livre até encontrar um outro ambiente para se estabelecer (WATNICK; KOLTER, 2000). Resumidamente, uma bactéria planctônica evolui para uma bactéria aderida, ocorre a formação de microcolônias e um biofilme

estabelecido, até um membro se destacar do biofilme à procura de um outro ambiente mais favorável.

A vida em comunidades microbianas possibilita vantagens para os microrganismos residentes, como a contribuição nutricional que pode ocorrer (simbionismo), a degradação de metabólitos tóxicos por uma espécie diferente, a proteção contra as defesas do hospedeiro e agentes antimicrobianos, e o aumento da capacidade patogênica. Marsh (2005) ressalta que bactérias do biofilme interagem com os vizinhos, funcionando como uma entidade coordenada, espacialmente organizada e metabolicamente integrada. O autor ainda aponta que existe uma relação direta entre o ambiente e a diversidade e abundância das espécies, ocorrendo dinamicamente e podendo mudar o ambiente a qualquer momento. Em resposta à inflamação gengival é possível que ocorra um aumento do fluido gengival, elevando a quantidade local de mediadores inflamatórios e nutrientes ricos em proteínas. Isso favorece o crescimento de microrganismos com metabolismo assacarolítico e redução do potencial redox.

Uma outra questão sobre a vida em comunidades microbianas é a habilidade de aquisição de elementos genéticos a uma razão acelerada, sugerindo que a transferência horizontal de genes pode ocorrer rapidamente em biofilmes, possibilitando a emergência de novos patógenos, através da aquisição de genes de resistência a antibióticos, fatores de virulência e capacidades de sobrevivência no ambiente (WATNICK; KOLTER, 2000).

A placa dental (biofilme dental) é uma estrutura organizada, porém não uniforme que varia de acordo com a localização do dente na arcada, e sobre a mesma unidade varia de acordo com o local para a qual a face está voltada, sendo o seu estágio de formação, um dos fatores de maior importância nos aspectos ecológicos e de potencial patogênico. Essa diferença é tanto estrutural quanto na composição bacteriana. Estudos relatam que o biofilme dental passa por uma progressão de organismos sendo os estreptococos os pioneiros seguidos pelo aparecimento de actinomicetes e ocasionalmente se convertendo para um biofilme maduro onde a prevalência é de Gram-negativos anaeróbios (ROSAN; LAMONT, 2000). Uma das características mais importantes do biofilme oral de humanos é a

capacidade de co agregação com outras bactérias orais. Co agregação pode ser definida como um reconhecimento célula - célula específico entre tipos celulares diferentes (KOLENBRANDER et al., 2006), podendo ser intra, inter ou multigenérico. Em muitas dessas associações a interação é específica, assim como podem ser os componentes envolvidos (KOLENBRANDER; LONDON, 1993).

Segundo Stoodley et al. (2002), as adaptações estruturais e inter relações dos organismos dentro dos biofilmes e conseqüentemente a sua sobrevivência são possíveis graças à expressão de um conjunto de genes que resultam em fenótipo diferente daqueles em estado planctônico. Beloin; Ghigo (2005) acrescentam que biofilmes representam um ambiente novo e desconhecido, no qual muitos genes com funções desconhecidas possam desempenhar algum papel, e estudos de Stanley et al (2003) revelam que cerca de 30-50% dos genes expressos em biofilme são compostos por genes com função desconhecida.

O Differential Display PCR (DD PCR), traduzido como Demonstração Diferencial de genes, é uma técnica desenvolvida por Liang e Pardee em 1992, inicialmente para eucariotos, que une duas poderosas ferramentas: a transcrição reversa (RT) e o PCR. Na primeira etapa o RNA das células é extraído no momento em que se deseja a comparação das amostras e purificado com o intuito de remover qualquer traço de DNA, para evitar a ocorrência de falsos negativos. Posteriormente esse RNA é submetido a uma reação de transcrição reversa, ou seja, a conversão do RNA mensageiro (mRNA) em DNA complementar (cDNA). Após essa etapa, através do PCR e de iniciadores aleatórios o cDNA é amplificado, pelo DD PCR, para a análise do perfil de expressão gênica das duas sub populações estudadas.

Fislage et al. (1997) adaptaram a técnica do DD PCR para o uso em procariotos, através da utilização de iniciadores específicos para o mRNA. Durante a realização da RT, os iniciadores possuem o códon terminação do mRNA, enquanto no DD PCR os iniciadores possuem o códon iniciação. Dessa forma, apenas regiões entre essas seqüências são amplificadas, as quais teoricamente correspondem à região do mRNA que transcreve alguma proteína.

Em bactérias orais a aplicação do DD PCR foi demonstrado por Tsai; Shi (2000) com *T. denticola*, onde os autores analisaram a expressão de genes através

da variação de temperatura e concluíram que a metodologia foi válida para identificação de genes expressos diferencialmente. A utilização do DD PCR para *P. gingivalis* foi descrita por diferentes autores com várias aplicações, mas com o objetivo comum de detectar genes que são diferencialmente expressos em uma determinada situação e não são em outra. Chung et al. (2001) estudaram a expressão diferencial do gene *luxS*, relacionado com moléculas de auto-indução em *Vibrio harveyi* (SURETTE; MILLER; BASSLER, 1999), em diferentes fases de crescimento de *P. gingivalis*, assim como em diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl), e James et al. (2006) encontraram que LuxS está envolvido na aquisição de hemina. A metodologia do DD PCR também foi usada por Park et al. (2004) para identificar genes diferencialmente expressos durante a invasão de *P. gingivalis* a células epiteliais gengivais e por Xie; Kozlova; Lamont (2004) para analisar os elementos envolvidos no processo de sinalização de *P. gingivalis* em resposta ao *Streptococcus cristatus*.

2 OBJETIVOS

- Verificar o padrão de adesão de isolados clínicos de *P. gingivalis* provenientes de diferentes condições periodontais, usando o modelo de formação de biofilme de espécies mistas.
- Verificar o perfil de expressão de genes de *P. gingivalis* provenientes de diferentes condições periodontais, através de Differential Display PCR.
- Verificar o perfil de expressão de genes de *P. gingivalis* entre células em estado planctônico e estabelecidas em biofilme, através de Differential Display PCR.
- Confirmar por PCR em Tempo Real a expressão diferencial dos genes verificada nas condições analisadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras clínicas

Foram selecionados pacientes apresentando evidência de periodontite crônica e pacientes com quadro clínico de saúde gengival. O diagnóstico de periodontite foi baseado em exame clínico, detecção da presença de bolsa periodontal maior que 4mm associada à perda de inserção, sangramento à sondagem e por exame radiográfico evidenciando perda óssea alveolar (ARMITAGE, 1999). O quadro clínico de saúde periodontal inclui os indivíduos que apresentaram condições de aparente normalidade clínica, ou seja, livres de cavidades de cárie, sem perda de inserção, sem sinais clínicos de inflamação gengival como alteração de cor, edema e ausência de sangramento ou patologias de manifestação bucal (FEATHERSTONE; ZERO, 1992). Todos os pacientes foram esclarecidos acerca do estudo e seus objetivos e que nenhum prejuízo seria causado à sua saúde em decorrência da sua participação. Consentimentos esclarecidos foram assinados por todos os participantes.

As coletas foram realizadas na Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Após a remoção do biofilme supragengival, a coleta foi realizada através da inserção de dois cones de papel esterilizados, durante 10 seg, em três sítios por paciente. Os cones foram transferidos para frascos contendo o meio de transporte VMGAIII (MÖLLER, 1966) e transportados ao Laboratório de Microbiologia Oral, onde foram manipulados em até 24 horas. Os frascos foram mantidos em estufa (Fanem Ltda, São Paulo, SP, Brasil) a 37 °C por 15 min, para a liquefação da gelatina e, em seguida, as amostras foram submetidas à diluição seriada em água peptonada. Alíquotas das diluições foram incubadas na superfície de placas de ágar sangue [Ágar Brucella (Acumedia – Lansing, MI, EUA)] suplementado com 5% de sangue de carneiro, extrato de levedura 0,5% (Difco, Detroit, MI, EUA), hemina (5µg/ml) (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e menadione (1µg/ml) (Sigma – Aldrich) em câmara de anaerobiose (COY Laboratory Products Inc., Grass Lake, MI, EUA) em atmosfera de 85% N₂, 5% CO₂ e 10% H₂ a 37 °C, por um período de 10 a 15 dias.

3.2 Identificação e seleção das amostras clínicas para formação de biofilme misto

As colônias pigmentadas de preto, presuntivas de *P. gingivalis* foram re-isoladas até obtenção de cultura pura e estocadas em solução de congelamento contendo glicerol 10% e congeladas a -80°C até o uso. Para confirmar a identificação as culturas foram desenvolvidas em Tryptic Soy Broth (TSB) suplementado com extrato de levedura 0,5%, hemina (5 $\mu\text{g/ml}$) e menadione (1 $\mu\text{g/ml}$) em câmara de anaerobiose por 24 a 48 horas a 37°C . O DNA cromossomal foi extraído pelo método do fenol-clorofórmio (ÁVILA-CAMPOS et al., 1999) e estocado a -20°C . Para a determinação da identidade de *P. gingivalis*, 100 ng do DNA cromossomal de cada amostra foi submetida à amplificação da região 16S rRNA de *P. gingivalis*, usando iniciadores espécie-específicos descritos por RUDNEY; TRAN (1996), com as seqüências descritas na Tabela 1. Controles positivos e negativos foram utilizados para cada prova. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) em gel de agarose (Fisher Scientific, Fair Lawn, MI, EUA) a 1%, pesquisando-se produto de 197 pb, específico para *P. gingivalis*.

Tabela 1: Iniciadores espécie-específicos de *P. gingivalis* 16SrRNA utilizados para identificação das amostras clínicas isoladas de pacientes com periodontite e com o periodonto saudável.

Iniciador	Seqüência (5' – 3')	Amplicon
PgF	TGTAGATGACTGATGTGTAAAACC	197 pb
PgR	ACGTCATCCCCACCTTCCTC	

Para a seleção dos isolados clínicos a serem estudados através do DD PCR, a formação de biofilme misto foi realizada segundo O'Toole; Kolter (1998), com modificações. Para isso, uma cultura de 24 h de *S. gordonii* Challis DL1 foi centrifugada a 6.000 rpm por 10 min (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e re-suspensa em caldo TSB até atingir a OD₆₀₀ de 0,2 (2×10^8 ufc de *S. gordonii*/ml). Alíquotas de 100 μl de cultura de *S. gordonii* contendo cerca 2×10^7 ufc/poço foi incubada em placa de 96 poços, por 24 horas em câmara de anaerobiose a 37°C , em agitador orbital Bio Shaker 3D (Biosan, Belo Horizonte, MG, Brasil) para promover adesão do

S. gordonii à superfície da placa. A placa foi removida da câmara, lavada com 200 µl de PBS para remoção das células não aderidas.

Em seguida, culturas de 24 h dos isolados clínicos de *P. gingivalis* foram centrifugadas a 5.500 rpm por 2 min e re-suspensas em TSB suplementado com extrato de levedura, hemina (5µg/ml) e menadione (1µg/ml) até atingirem a OD₆₆₀ de 0,1 (10⁸ ufc de *P. gingivalis*/ml). Alíquotas de 100 µl (2 x 10⁶ ufc/poço) de cada isolado de *P. gingivalis* foram adicionadas aos devidos poços para possibilitar a formação do biofilme de espécie mista e as placas foram incubadas nas mesmas condições citadas anteriormente, sob agitação. Após 24 horas de incubação, as placas foram lavadas com PBS, o conteúdo foi desprezado e as placas foram invertidas para rápida secagem com auxílio de papel toalha, a cada poço foi adicionado 100 µl de cristal violeta 0,1%. Após 15 min nova lavagem foi realizada com PBS e então 120 µl de etanol 95% foi adicionado aos poços para a solubilização do corante. As placas foram submetidas à leitura em leitor de placas (Benchmark Microplate Reader 680 a 540 nm, Bio-Rad). Biofilmes controle individual de *S. gordonii* e de *S. gordonii* com cepas padrão de *P. gingivalis* (ATCC 33277 e W83) foram realizados para verificar a capacidade de formação de biofilme das espécies. Foram selecionados para os experimentos de Differential Display PCR, os isolados clínicos com maior capacidade de formação de biofilme com *S. gordonii*, tanto de pacientes com saúde bucal como com periodontite crônica.

3.3 Condições experimentais da formação do biofilme para avaliação da expressão gênica por DD PCR

Para a análise do perfil de expressão gênica, foi usado o modelo de formação de biofilme proposto por O'Toole; Kolter (1998), com modificações, que permitiu a extração do RNA tanto das células em estado planctônico como em biofilme. Para isso, utilizamos placas de 12 poços de polipropileno (TPP, Trasadingen, Suíça) em triplicata para cada amostra. Uma cultura de *S. gordonii* Challis DL1 se desenvolveu em TSB overnight a 37 °C em câmara de anaerobiose. Após a incubação, a suspensão foi padronizada em TSB para conter 4 x 10⁸ ufc/ml de meio e volumes de

4ml foram distribuídos pelos poços, estas placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C em câmara de anaerobiose, sobre agitador orbital. Após este período, a suspensão celular foi removida, deixando apenas as células de *S. gordonii* aderidas, as placas foram lavadas com PBS, o conteúdo foi desprezado e as placas foram invertidas para completa secagem com auxílio de papel toalha. Em seguida, culturas dos isolados clínicos de pacientes sadio e doente de *P. gingivalis*, desenvolvidas por 24 horas, foram padronizadas para conter cerca de 6×10^8 ufc/ml de meio. Foram distribuídos 4ml de cultura em cada poço com o biofilme de *S. gordonii* previamente formado, as placas foram incubadas por 24 horas, a 37 °C em câmara de anaerobiose, sobre agitador orbital. Após este período, alíquotas de 3 ml das suspensões celulares de cada poço contendo as células de *P. gingivalis* em estado planctônico foram transferidas para um tubo Falcon (Corning Costar, NY, EUA) de 50 ml (Fração planctônica) e reservadas, o restante do conteúdo foi desprezado e as placas foram invertidas para rápida secagem com auxílio de papel toalha e imediatamente à cada poço foi adicionado o reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

3.4 Isolamento de RNA

O isolamento do RNA foi realizado pelo reagente Trizol, conforme instruções do fabricante para bactérias Gram negativas. Um total de 2 ml de Trizol para cada placa permaneceu em contato com as células do biofilme por um período de 5 min, tempo suficiente para romper as células de *P. gingivalis*, mas insuficiente para as células Gram positivas de *S. gordonii* (SIMIONATO et al., 2006), para cada reação 2 tubos de 2 ml foram utilizados. Os tubos contendo as frações planctônicas foram centrifugados a 6.000 rpm por 4 min, o sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 2 ml de Trizol, que permaneceu em contato com as células por 5 min e foi separado em 2 tubos de 2 ml com igual volume. Após a adição do Trizol o RNA foi extraído com 200 µl de clorofórmio (Lab. Synth – Diadema, SP - Brasil), precipitado com 500 µl de isopropanol (Lab. Synth – Diadema, SP - Brasil), lavado com 1 ml de etanol 75% (Carlo Erba Reagents – Milano, Itália) e ressuspensos em água livre de

nucleases (Ambion, Foster City, CA, EUA). As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Qiagen) por 10 min a 25 °C e transferidas para as colunas do RNEasy minikit (Qiagen) para remoção de DNA contaminante. Como controles do isolamento de RNA, 3 ml de uma das suspensões de *P. gingivalis*, assim como 3 ml da suspensão de *S. gordonii* foram também distribuídos no mesmo tipo de tubo e incubados igual e simultaneamente com as amostras experimentais. Outro controle, fundamental para a redução de falsos resultados positivos, foi a verificação da ausência de contaminação de DNA nas amostras de RNA. Para isso, todas as amostras de RNA foram submetidas a reações de Transcrição Reversa (RT) com todos os reagentes, exceto a enzima, seguidas de amplificação por PCR usando iniciadores específicos para *P. gingivalis* ou *S. gordonii*. Gel de agarose do produto final destas reações não mostrou nenhuma amplificação, descartando a possibilidade de falsos positivos.

3.5 DD PCR

3.5.1 Transcrição Reversa (RT)

Para cada amostra de RNA foi realizada reação de RT, a partir de 2 µg de RNA (CHUNG et al., 2001) e foram utilizados 1 µl (50 pmol) de cada um dos três tipos de iniciadores desenvolvidos por Fislage et al. (1997) com as seqüências apresentadas na tabela 2; além de RNase OUT 40 U/µl (Invitrogen) e a enzima Superscript III (Invitrogen). A mistura foi incubada em Termociclador (Bio-Rad) por 1 hora a 42 °C e por 15 min a 70 °C para inativação da enzima, e imediatamente colocada em gelo.

Tabela 2: Iniciadores para RT identificados como DDF e iniciadores para DD PCR identificados como DDR, descritos por Fislage et al. (1997).

Iniciador	Seqüência (5'-3')
DDF5	TTTCAGCGCCT
DDF6	TTTTTTCAGCA
DDF7	TCTTTTTTACC
DDR6	ATGCGCTGGC
DDR9	ATGGCGCTGG

3.5.2 Amplificação do cDNA por DD PCR

A reação de amplificação do cDNA (DNA complementar) continha 5 µl da reação de Transcrição Reversa, 1 µl (50 pmol) de apenas um dos iniciadores para o Differential Display (DD PCR) desenvolvido por Fislage et al (1997) demonstrados na Tabela 2, 1 µl 10 mM de dNTP, 2,5 µl de 10 x PCR buffer, 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM e 0,5 µl de *Taq* Polymerase Platinum (Invitrogen). A reação teve os seguintes parâmetros termo cíclicos: 94 °C x 2 min (ativação da enzima), seguidos de 40 ciclos de 94 °C x 30 seg, 40 °C x 2 min, 72 °C x 30 seg e seguidos por uma extensão final de 72 °C x 5 min.

3.5.3 Caracterização dos produtos expressos diferencialmente

Para visualizar os produtos do D PCR, 9 µl de cada reação foram misturados com 9 µl de loading dye (Novagen, Darmstadt, Alemanha) e os 18 µl de cada reação foram aplicados em um gel agarose 1%. Foram realizadas comparações, através de gel, entre as amostras de biofilmes coletadas de pacientes com periodontite com as amostras de biofilme de pacientes saudáveis com as quatro combinações de iniciadores do DD PCR (DDF5 X DDR6, DDF6 X DDR9, DDF7 X DDR6 e DDF7 X DDR9). O mesmo procedimento foi realizado entre as amostras planctônicas e biofilme de pacientes com periodontite e entre as amostras planctônicas e biofilme de

pacientes saudáveis. Cada eletroforese foi realizada a 100 V (Bio-Rad) por 25 min, após esse período, o gel permaneceu em tampão pós-corrida [(100 ml de tampão TAE; 10 µl de brometo de etídio 10 mg/ml (Bio-Rad)] por 5 min. Para auxiliar na visualização e presumir o tamanho das bandas, marcador de peso molecular de 100 pb (Norgen, Thorold, ON, Canada) foi utilizado durante a corrida.

3.5.4 Isolamento e adição de adeninas aos produtos do DD PCR

Os géis do DD PCR foram fotografados e analisados para verificar as bandas diferencialmente expressas, as quais foram excisadas do gel com auxílio de um bisturi e purificadas do gel de agarose com o QIAquick gel extraction kit (Qiagen).

Os produtos da purificação foram submetidos a uma reação de incorporação de adeninas à sua terminação 3', conforme sugestão do fabricante da transformação (Invitrogen). Aos 10 µl do produto da purificação do gel de agarose foram adicionados 0,5 µl de *Taq* Platinum polimerase (Invitrogen), 1 µl de 10 mM de dATP, 0,6 µl de 50 mM MgCl₂, 1,5 µl de tampão 10x e água destilada até 15 µl. A reação ficou incubada por 10 min a 72 °C (Bio-Rad).

3.5.5 Clonagem e sequenciamento dos produtos do DD PCR

Imediatamente após a adição de adenina foi realizada a Reação de Ligação para a transformação. Quatro microlitros do produto da adição de adeninas foram incubados com 1 µl de solução salina (50 mM NaCl; 2,5 mM MgCl₂) e 1 µl do vetor pCRII TOPO TA Cloning (Invitrogen) por 30 min a 37 °C. Três microlitros da reação de ligação foram adicionados à alíquota de 55 µl de células eletrocompetentes de *E. coli* DH5α, essa mistura foi submetida à eletroporação por 2 seg em cubetas de eletroporação e eletroporador Micro Pulser (ambos Bio-Rad). Para cada eletroporação foram adicionados 250 µl de caldo SOC, a reação permaneceu incubada em agitação (200 rpm) por 1 hora a 37 °C, cerca de 100 µl da cultura foi plaqueada em agar Luria Bertani suplementado com kanamicina 50 µg/ml (Sigma –

Aldrich, St Louis, MO, EUA) e X-Gal 40µg/ml (Sigma – Aldrich). As placas foram incubadas aerobicamente a 37 °C overnight. As colônias crescidas identificadas como transformantes (coloração branca) foram repicadas nas mesmas condições anteriores. O repique das colônias foi repassado para tampão TE (Tris EDTA) e a partir de 1 µl dessa solução foi realizado PCR para verificar a presença do inserto, foram utilizados iniciadores M13, específicos para o vetor da transformação.

Foi feito um gel de agarose para verificar a presença do inserto no interior do fragmento do vetor amplificado. Aqueles amplicons com tamanho superior a 167 pb (tamanho do fragmento amplificado sem o inserto) foram submetidos à reação de sequenciamento com Big Dye [Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA)]: DNA (100-200ng); iniciador (10 pmol/µl); 3 µl de tampão de sequenciamento 5 X; 2 µl de Big Dye v3.1; água até 15 µl e foram incubados em termociclador com o seguinte ciclo: 96 °C por 2 min, seguidos de 35 ciclos de 96 °C por 45 seg, 50 °C por 30 seg e 60 °C por 4 min. A reação foi precipitada usando uma mistura contendo etanol 100%, acetato de sódio 3M e glicogênio 1 mg/ml (29 µl, 1,2 µl, 1,2 µl respectivamente em cada reação) e após centrifugação, foi lavada com etanol 70% e seca por 1 min a 95 °C antes do envio para sequenciamento no Laboratório de Bioquímica (IQ/USP, São Paulo, Brasil).

As seqüências foram analisadas no TIGR/ BLAST (<http://blast.jcvi.org/cmr-blast/>) para verificar analogia com genes conhecidos de *P. gingivalis* ou analogia com genes de outras bactérias. Posteriormente, as seqüências dos genes correspondentes foram analisadas pelo site www.mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/dna-form1.cgi para verificar sua estrutura secundária. Os iniciadores foram desenhados com auxílio do site www.genscript.com e sintetizados para confirmação do resultado obtido no DD PCR por PCR em tempo real.

3.6 Confirmação por PCR em Tempo Real

Para cada condição estudada, biofilme de saudável e de periodontite e planctônico de saudável e de periodontite, as reações foram feitas em triplicata para a

confirmação dos resultados encontrados no DD PCR. A RT ocorreu da mesma forma da citada anteriormente, exceto pela concentração de RNA (1 µg para cada 20 µl de reação) e o uso de iniciadores randômicos (Invitrogen) no lugar dos iniciadores sugeridos por Fislage et al. (1997). A mistura foi incubada a 25 °C por 5 min, a 42 °C over night, e a 70 °C por 15 min para inativação da enzima e colocada em gelo imediatamente.

Tabela 3: Genes de *P. gingivalis* e iniciadores específicos para cada gene desenhados a partir do site www.genscript.com para confirmação dos resultados do DD PCR por PCR em Tempo Real.

Gene		Seqüência dos iniciadores (5' – 3')	Referência	Amplicon
Pg 16S rRNA	F	TGTAGATGACTGATGTGTAAAC	Rudney; Tran, 1996	197 pb
	R	ACGTCATCCCCACCTTCCTC		
PG 0069	F	ATTCCTCTCCGCTGGTTTTT	Este estudo	208 pb
	R	AGTTCTCGCGAGTGAGGTGT		
PG 0076	F	ACCTATCGTACCGACGATGC	Este estudo	117 pb
	R	TTTGAACAGGGGACGATAGC		
PG 0118	F	ATGAGCCAAATTACGCAAGG	Este estudo	104 pb
	R	CCAGCATGGTATTTCCCAAC		
PG 1118	F	CAGGGAAATAGCCGAAC	Este estudo	206 pb
	R	CGATCTCCGTCTCTTTCTGC		
PG 0598	F	AGCTATGCGTGGGGAATATG	Este estudo	180 pb
	R	TTGGCAGCCTGCTCTATTTT		
PG 1321	F	GACAGCCATTACGCCGAACAAG	Simionato et al., 2006	129 pb
	R	AAGCAAGGTCCGAGCGAAGG		
PG 1331	F	GGAACCAAGGAAGTGAAGCA	Este estudo	214 pb
	R	GAGTACCGGCGTGTGATT		
PG 1367	F	CAGGGAGAAGAGCGTTATGC	Este estudo	157 pb
	R	GACAACTCTCCTCCGTCAGC		
PG 1372	F	GAGGATGGCATTGTTCTGGA	Este estudo	126 pb
	R	AGGACAAAAACGGTCACTGG		
PG 1580	F	TCCTGATTTCCGATTTCCAG	Este estudo	164 pb
	R	AGTCTGCCCTGTCTCTGCAT		
PG 1748	F	ATGGGTGTATCGGAGCTGAC	Este estudo	207 pb
	R	CGGTTTCGTGAGTAGGACCAT		
PG 2003	F	TATCACACGCGGACTGAAAG	Este estudo	228 pb
	R	CCTTCGAAGTGCAGGAAGTC		

Após a realização da RT as amostras foram mensuradas em relação à concentração de cDNA, e igualadas para evitar falsos positivos durante a realização do PCR em tempo real. As amostras de cDNA foram submetidas ao PCR em Tempo Real em triplicata em placas de 96 poços (Bio-Rad). Em cada poço foi adicionado: 2 µl de cDNA molde; 1 µl de cada iniciador (F e R) específico para cada gene, descritos na Tabela 3 na concentração de 50 pmol; 8,5 µl de água livre de nuclease; e 12,5 µl da mistura de SYBR Green (Bio-Rad). Como controle negativo foi usada água livre de nuclease como molde, e o gene 16SrRNA serviu como controle interno da expressão de genes, para confirmar que a concentração do cDNA estava equalizada.

A placa de 96 poços foi selada com filme plástico e submetida ao ciclo de PCR em tempo real (BioRad IQ5), de acordo com os seguintes parâmetros termocíclicos: 95 °C por 3 min; e 40 ciclos de 95 °C por 10 seg, 60 °C por 45 seg. Após os 40 ciclos, foi realizada uma curva de dissociação com temperatura inicial de 60 °C, aumentando gradativamente 0,4 °C a cada 10 seg até atingir a temperatura de 99,6 °C.

Os dados de cada gene foram analisados separadamente de acordo com as comparações desejadas: biofilme de saudável com biofilme de periodontite; biofilme de saudável com planctônico de saudável; e biofilme de periodontite com planctônico de periodontite, utilizando o programa Bio-Rad IQ5. Os valores do Ct (Threshold cycle, ciclo no qual o produto da amplificação passa a ter diferença significativa em relação ao *background*) de cada amostra em uma situação (teste 1) foram comparados relativamente com os valores da amostra de outra situação (teste 2) para um determinado gene (gene A). A amostra teste escolhida para ser o controle foi a que apresentou o maior valor de média do Ct, isto é, a de menor expressão e o programa forneceu a quantidade relativa entre eles. A partir deste valor determinou-se o quanto o gene foi mais expresso em uma situação do que na outra.

4 RESULTADOS

Biofilmes controle de *S. gordonii* e de *S. gordonii* com cepas padrão de *P. gingivalis* ATCC 33277 e W83 foram realizados com o intuito de comprovar a formação do biofilme misto entre eles. Os valores da média de cada uma dessas provas estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores da média de formação de biofilme simples de *S. gordonii* e biofilme de amostras padrão de *P. gingivalis*.

Amostra	Média	Desvio padrão
<i>S. gordonii</i> DL1	0,195	0,037
33277	0,249	0,032
W83	0,224	0,034

Dentre as amostras isoladas e identificadas como *P. gingivalis* de pacientes saudáveis e com doença periodontal submetidas à formação de biofilme misto com *S. gordonii*, as que melhor formaram biofilme em cada situação foram escolhidas para a caracterização de produtos expressos diferencialmente por DD PCR. As amostras selecionadas foram P7 e S4 (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5. Valores da média de formação de biofilme misto entre *S. gordonii* e amostras clínicas de *P. gingivalis* isoladas de pacientes com periodontite.

Amostra	Média	Desvio padrão
P1	0,345	0,036
P2	0,360	0,035
P3	0,275	0,014
P4	0,295	0,021
P5	0,394	0,023
P6	0,321	0,028
P7	0,562	0,093
P8	0,207	0,030
P9	0,398	0,030
P10	0,356	0,065
P11	0,284	0,027
Media	0,345	0,091

Tabela 6. Valores da média de formação de biofilme misto entre *S. gordonii* e amostras clínicas de *P. gingivalis* isoladas de pacientes com periodonto saudável.

Amostra	Média	Desvio padrão
S1	0,185	0,030
S2	0,322	0,042
S3	0,171	0,021
S4	0,439	0,085
S5	0,192	0,018
S6	0,294	0,038
S7	0,260	0,020
S8	0,310	0,040
S9	0,319	0,026
S10	0,377	0,014
S11	0,349	0,040
Media	0,292	0,084

Apesar de haver diferenças na média da formação de biofilme entre as amostras de pacientes saudáveis e com periodontite, não houve significância estatística, como confirmado pelo *p* valor obtido pelo *t* test (Figura 1).

Figura 1: Análise comparativa das médias de formação de biofilme misto entre *S. gordonii* e amostras clínicas de *P. gingivalis* (periodontite e saudável) por OD₅₄₀
 p valor = 0,176

Após a extração de RNA e Transcrição Reversa com iniciadores DDF descritos na Tabela 2, o Differential display foi realizado utilizando os iniciadores DDR descritos na Tabela 2. As bandas expressas diferencialmente foram identificadas através de eletroforese em gel de agarose 1%, e numeradas para facilitar posterior identificação e interpretação dos resultados. A observação das fotografias dos géis de agarose demonstrou diferenças na expressão de genes nas condições experimentais, principalmente entre as amostras de biofilme de pacientes com periodontite e saudáveis.

Figura 2. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF5 e DDR6 foram submetidos à eletroforese, evidenciando bandas expressas diferencialmente entre amostras de Biofilme de Saudável (BS) e Biofilme de Periodontite (BP).

Figura 3. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF6 e DDR9 foram submetidos à eletroforese, evidenciando bandas expressas diferencialmente entre amostras de Biofilme de Saudável (BS) e Biofilme de Periodontite (BP).

Figura 4. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF7 e DDR6 foram submetidos à eletroforese, evidenciando bandas expressas diferencialmente entre amostras de Biofilme de Saudável (BS) e Biofilme de Periodontite (BP).

Figura 5. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF7 e DDR9 foram submetidos à eletroforese, evidenciando bandas expressas diferencialmente entre amostras de Biofilme de Saudável (BS) e Biofilme de Periodontite (BP).

Figura 6. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF5 e DDR6 foram submetidos à eletroforese, evidenciando banda expressa diferencialmente entre amostras de Biofilme de Saudável (BS) e Planctônico Saudável (PS).

Figura 7. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF6 e DDR9 foram submetidos à eletroforese, evidenciando bandas expressas diferencialmente entre amostras de Biofilme de Saudável (BS) e Planctônico de Saudável (PS).

Figura 8. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF7 e DDR6 foram submetidos à eletroforese, sem evidências de bandas expressas diferencialmente entre amostras de Biofilme de Saudável (BS) e Planctônico de Saudável (PS).

Figura 9. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF7 e DDR9 foram submetidos à eletroforese, evidenciando bandas expressas diferencialmente entre amostras de Biofilme de Saudável (BS) e Planctônico de Saudável (PS).

Figura 10. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF5 e DDR6 foram submetidos à eletroforese, sem evidências de bandas expressas diferencialmente entre amostras de Biofilme de Periodontite (BP) e Planctônico de Periodontite (PP).

Figura 11. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF6 e DDR9 foram submetidos à eletroforese, evidenciando bandas expressas diferencialmente entre amostras de Biofilme de Periodontite (BP) e Planctônico de Periodontite (PP).

Figura 12. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF7 e DDR6 foram submetidos à eletroforese, evidenciando bandas expressas diferencialmente entre amostras de Biofilme de Periodontite (BP) e Planctônico de Periodontite (PP).

Figura 13. Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação utilizando iniciadores DDF7 e DDR9 foram submetidos à eletroforese, sem evidências de bandas expressas diferencialmente entre amostras de Biofilme de Periodontite (BP) e Planctônico de Periodontite (PP).

Tabela 7. Lista de genes expressos diferencialmente, com seus respectivos nomes, siglas e funções, além da banda e comparação na qual foram encontrados. Em se tratando de proteínas hipotéticas, suas seqüências foram comparadas com seqüências de proteínas conhecidas de outras bactérias e sua função foi reportada para a tabela. Biofilme de saudável (BS); biofilme de periodontite (BP); planctônico de saúde (PS); planctônico de periodontite (PP); **XX** – amostra na qual o gene foi expresso positivamente.

Gene	Locus	Gene	Analogia	Função	Banda	Comparação
PG 0069	Proteína hipotética		Açúcar quinase (<i>B. fragilis</i> , <i>B. thetaiotaomicron</i> , <i>T. tengcongensis</i> , <i>N. europaea</i> ATCC 19718)*	Metabolismo energético: transporte de elétron ^{*2}	13	BS X BP
PG 0069	Proteína hipotética		idem *	idem ^{*2}	30	BS X PS
PG 0076	N-acetilmuramoil-L-alanina amidase			Envelope celular: biossíntese e degradação de polissacarídeos e lipopolissacarídeos de superfície.	2	BP X PP
PG 0118	Glicosiltransferase			Envelope celular: biossíntese e degradação de polissacarídeos e lipopolissacarídeos de superfície	12	BS X BP
PG 0185	Protein ragA	<i>ragA</i>		Função desconhecida	16	BS X BP
PG 0187	ISPg6, transposase			Elementos extracromossomais móveis. Função de transposon	16	BS X BP
PG 0598	Proteína hipotética		Permease de membrana (<i>B. fragilis</i> , <i>P. intermedia</i>)	Proteína de ligação e transporte. Substrato desconhecido	17	BS X BP
PG 1118	Proteína ClpB	<i>clpB</i>		Proteína de degradação de peptídios e glicopeptídios	26	BS X PS
PG 1321	Formato-tetrahidrofolato ligase	<i>fhs</i>		Metabolismo intermediário central, metabolismo de carbono único.	17	BS X BP
PG 1331	NAD(P) transhidrogenase, subunid. Alfa	<i>pntA</i>		Metabolismo energético: transporte de elétron	9	BS X BP
PG 1367	Proteína hipotética		Proteína hipotética		16	BS X BP
PG 1372	Proteína hipotética		Proteína de exportação (<i>B. fragilis</i>)	Proteína de exportação presuntiva (<i>B. fragilis</i>).	25	BS X PS
PG 1580	Proteína hipotética		von Willebrand factor (<i>Chlorobium chlorochromatii</i>)	Função desconhecida	12	BS X BP
PG 1748	Transcetolase	<i>tkt</i>		Metabolismo energético: via das pentoses fosfato	20 22	BS X BP
PG 2003	Desoxiguanosina trifosfato trifosfohidrolase	<i>dgt</i>		Piurinas, pirimidinas, nucleosídeos e nucleotídeos. Interconversão de nucleotídeos e nucleosídeos.	28	BS X PS

Os resultados obtidos pelo PCR em tempo real confirmaram a expressão diferencial de alguns dos genes obtidos no DD PCR e a partir dos dados fornecidos pelo PCR em tempo real e análise no software Bio-Rad IQ5 pode-se determinar a expressão relativa entre as amostras e conseqüentemente a diferença na expressão do gene entre elas, conforme apresentado nas Tabelas 8 a 43.

Tabela 8. Expressão relativa de PG 0069 Proteína hipotética (açúcar quinase), através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
PS	1,3276	30,84	1,34
BS	1	31,25	

Tabela 9. Expressão relativa de PG 0069 Proteína hipotética (açúcar quinase), através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e periodontite (BP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
BP	2,39008	29,19	2,39*
BS	1	30,44	

* $p < 0,05$

Tabela 10. Expressão relativa de PG 0069 Proteína hipotética (açúcar quinase), através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
PP	1	29,94	1,48
BP	1,47987	29,37	

Tabela 11. Expressão relativa de PG 0076 *N*-acetilmuramoil-L-alanina, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
PS	1,28847	25,03	1,28
BS	1	25,4	

Tabela 12. Expressão relativa de PG 0076 *N*-acetilmuramoil-L-alanina, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e periodontite (BP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
BP	1,56698	25*	1,57
BS	1	25,64	

* $p < 0,05$

Tabela 13. Expressão relativa de PG 0076 *N*-acetilmuramoil-L-alanina, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
PP	1	25,26	1,1
BP	1,10752	25,11	

Tabela 14. Expressão relativa de PG 0118 Glicosiltransferase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
PS	1,45636	36,95*	1,45
BS	1	37,49	

* $p < 0,05$

Tabela 15. Expressão relativa de PG 0118 Glicosiltransferase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e biofilme de periodontite (BP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
BP	1,67131	36,68	1,67
BS	1	37,42	

Tabela 16. Expressão relativa de PG 0118 Glicosiltransferase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
PP	1,3225	36,95	1,32
BP	1	37,49	

Tabela 17. Expressão relativa de PG 0187 *ISPg6*, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
PS	1,02594	30,85	1,03
BS	1	30,89	

Tabela 18. Expressão relativa de PG 0187 *ISPg6*, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e biofilme de periodontite (BP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
BP	1	30,98	2,33
BS	2,30979	29,77*	

* $p < 0,05$

Tabela 19. Expressão relativa de PG 0187 ISPg6, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
PP	1,74674	30,07	1,75
BP	1	30,88	

Tabela 20. Expressão relativa de PG 0598PG Proteína hipotética, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
PS	1,16646	30,16	1,67
BS	1	30,38	

Tabela 21. Expressão relativa de PG 0598 Proteína hipotética, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e biofilme de periodontite (BP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
BP	1,22314	30,04	1,22
BS	1	30,33	

Tabela 22. Expressão relativa de PG 0598 Proteína hipotética, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
PP	1	30,52	1,27
BP	1,27586	30,17	

Tabela 23. Expressão relativa de PG 1118 Proteína ClpB, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
PS	1	31,1	2,24
BS	2,23455	29,94*	

* $p < 0,05$

Tabela 24. Expressão relativa de PG 1118 Proteína ClpB, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e biofilme de periodontite (BP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
BS	1,12359	29,2	1,13
BP	1	29,37	

Tabela 25. Expressão relativa de PG 1118 Proteína ClpB, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
BP	1,17775	30,27	1,78
PP	1	30,5	

Tabela 26. Expressão relativa de PG 1321 Formato tetrahydrofolato ligase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
BS	5,16863	28,68*	5,26
PS	1	31,05	

* $p < 0,05$

Tabela 27. Expressão relativa de PG 1321 Formato tetrahydrofolato ligase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e biofilme de periodontite (BP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
BP	1	30,28	2,63
BS	2,64136	28,88*	

* $p < 0,05$

Tabela 28. Expressão relativa de PG 1321 Formato tetrahydrofolato ligase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
PP	1	30,36	1,25
BP	1,25465	30,03	

Tabela 29. Expressão relativa de PG 1367 Proteína hipotética (permease de membrana), através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
PS	1,14522	29,41	1,14
BS	1	29,6	

Tabela 30. Expressão relativa de PG 1367 Proteína hipotética, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e biofilme de periodontite (BP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
BS	1	30,24	2,12
BP	2,05523	29,2	

Tabela 31. Expressão relativa de PG 1367 Proteína hipotética, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
PP	2,10252	29,8	2,1
BP	1	30,88	

Tabela 32. Expressão relativa de PG 1372 Proteína hipotética (proteína de exportação), através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
PS	1,42614	30,64	1,43
BS	1	31,15	

Tabela 33. Expressão relativa de PG 1372 Proteína hipotética (proteína de exportação), através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e biofilme de periodontite (BP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
BP	1	31,35	1,47
BS	1,47142	30,79	

Tabela 34. Expressão relativa de PG 1372 Proteína hipotética (proteína de exportação), através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
PP	1,17723	31,09	1,18
BP	1	31,32	

Tabela 35. Expressão relativa de PG 1580 Proteína hipotética (fator de von Willebrand), através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
PS	1	30,42	1,89
BS	1,88504	29,5	

Tabela 36. Expressão relativa de PG 1580 Proteína hipotética (fator de von Willebrand), através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e biofilme de periodontite (BP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
BS	1	30,37	2,27
BP	2,2521	29,2	

Tabela 37. Expressão relativa de PG 1580 Proteína hipotética (fator de von Willebrand), através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
PP	1,61209	29,59	1,61
BP	1	30,28	

Tabela 38. Expressão relativa de PG 1748 Transcetolase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
BS	1,16971	29,91	1,17
PS	1	30,14	

Tabela 39. Expressão relativa de PG 1748 Transcetolase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e biofilme de periodontite (BP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
BP	1	32,03	3,33
BS	3,28237	30,31	

Tabela 40. Expressão relativa de PG 1748 Transcetolase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
PP	2,69681	30,66	2,7
BP	1	32,09	

Tabela 41. Expressão relativa de PG 2003 Desoxiguanosina trifosfato trifosfohidrolase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e planctônico de saudável (PS).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
PS	1,0864	30,59	1,07
BS	1	30,71	

Tabela 42. Expressão relativa de PG 2003 Desoxiguanosina trifosfato trifosfohidrolase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de saudável (BS) e biofilme de periodontite (BP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
BS	1	29,99	1,06
BP	1,0593	29,9	

Tabela 43. Expressão relativa de PG 2003 Desoxiguanosina trifosfato trifosfohidrolase, através de PCR em tempo real, entre as amostras de biofilme de periodontite (BP) e planctônico de periodontite (PP).

Amostra	Expressão Relativa	Média Ct	Razão entre as amostras
PP	1	32,41	1,89
BP	1,90375	31,48	

5 DISCUSSÃO

A doença periodontal é uma doença inflamatória crônica destrutiva que ocorre como resultado de ações complexas de bactérias periodontais (AMANO, 2003), associada a um número reduzido de bactérias (ZAMBON, 1996). Espécies como *actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *C. rectus*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* são consideradas periodontopatógenos (HAFFAJEE; SOCRANSKY, 1994), pois são capazes de produzir toxinas e induzir a liberação de mediadores inflamatórios responsáveis pela destruição dos tecidos do hospedeiro (LAMONT; JENKINSON, 1998).

P. gingivalis, juntamente com outras espécies consideradas como periodontopatógenos, foi detectada em pacientes com periodontite e pacientes com periodontite refratária, mas também em pacientes com periodonto saudável (DZINK; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1988; TANNER et al., 1998; XIMÉNEZ-FYVIE et al., 2000; VAN WINKELHOFF et al., 2002; SOCRANSKY et al., 2002). A bactéria possui diversos fatores de virulência implicados com o início e progressão das doenças periodontais como proteases, fímbrias, LPS e a necessidade de aquisição de nutrientes (GENCO et al., 1995; IMAMURA et al., 1995; LAMONT; JENKINSON, 1998; HAMADA et al., 2002).

A colonização de *P. gingivalis* à cavidade bucal ocorre principalmente pela adesão da bactéria a colonizadores iniciais do biofilme dental, como actinomicetes e estreptococos, mais especificamente *S. gordonii*. A adesão entre eles é específica e bimodal, ocorre inicialmente entre a fímbria maior (FimA) de *P. gingivalis* e GAPDH, presente na superfície de *S. gordonii*, e é estabilizada pela fímbria menor (Mfa1) que adere à proteína SspB (CHUNG; DEMUTH; LAMONT, 2000; MAEDA et al., 2004; PARK et al., 2005).

Microrganismos são normalmente encontrados no ambiente vivendo em biofilmes, pois a vida em comunidades confere vantagens nutricionais e proteção contra as defesas do hospedeiro e antimicrobianos, além de poder proporcionar o aumento da capacidade patogênica (MARSH, 2005). A passagem do estado planctônico para o biofilme envolve uma série de modificações nas células, visando preparar o organismo

para a vida em comunidades, dessa forma, o perfil de genes difere daquele do estado planctônico (STOODLEY et al., 2002).

A metodologia do DD PCR foi desenvolvida por Liang e Pardee (1992) para verificar a expressão de genes de uma determinada população celular, submetida a diferentes condições experimentais. Essa técnica foi aplicada para diferentes bactérias orais (ZHAO; NEWSOME; CIHLAR, 1998; GILL; VALDES; BENTLEY, 1999; TSAI; SHI, 2000; DU; KOLENBRANDER, 2000), incluindo *P. gingivalis*. (BONASS et al. 2000; CHUNG et al., 2001; PARK et al., 2004; SHELBURNE et al., 2005; JAMES, et al., 2006), objetivando analisar a resposta a variados estímulos e condições.

Nesse estudo foi analisado, através do DD PCR, a expressão de genes de *P. gingivalis* expressos diferencialmente durante a formação de biofilme com *S. gordonii*. A pesquisa em banco de dados de genes (BLAST) apontou para genes de *P. gingivalis* relacionados com fatores de virulência, outros com aquisição de energia e ainda proteínas de transporte e de membrana. Nem todos os genes tiveram sua expressão diferencial comprovada, aqueles que foram diferencialmente expressos e comprovados por uma segunda metodologia, estão descritos mais detalhadamente.

Glicosiltransferase (PG 0118)

Glicosiltransferases (GT) são enzimas envolvidas na transferência de resíduos de açúcar de um substrato doador ativado, normalmente um açúcar nucleotídeo, para um grupo carbohidrato crescente. A especificidade da enzima pelo seu substrato doador e aceptor constituem a base primária para determinar a estrutura da cadeia de açúcar produzida pela célula (PAULSON; COLLEY, 1989). A glicosilação é importante para procariotos e eucariotos, requerendo uma ação coordenada de um grande número de enzimas (glicosiltransferases). Dentre as principais famílias de GT as mais importantes são as sialiltransferases, fucosiltransferases e galactosiltransferases (BRETON; IMBERTY, 1999). Segundo descrição do banco de dados do TIGR, a função de glicosiltransferase está relacionada com a síntese e degradação de polissacarídeos e LPS de superfície.

A região peptídica altamente conservada identificada em cada família tem relação com a função principal da enzima. A característica comum dentro de uma família de GT é geralmente o uso do mesmo açúcar nucleotídeo ou alternativamente da mesma porção nucleotídica (UDP) (BRETON et al., 2007). Os resíduos envolvidos na ligação do aceptor são normalmente localizados em regiões variáveis e eles são provavelmente bem conservados em cada família de GT, compartilhando a mesma especificidade de aceptor (BRETON; IMBERTY, 1999).

Nos bancos de dados existem mais de 12.000 GT presuntivas e conhecidas (BRETON et al., 2007). Yamamoto et al. (1990) relatam que a suposição da função de uma GT pela sua sequência não é aplicável, pois existem muitos exemplos de sequências altamente relacionadas com atividades catalíticas diferentes, por exemplo, as transferases do sangue do grupo A e B, diferem em apenas quatro aminoácidos, mas possuem doador glicosil diferente.

Davey; Duncan (2006) criaram uma mutação deletional no gene PG0106 com similaridade com a glicosiltransferase (~61%), e afirmaram que houve aumento na formação de biofilme nas cepas padrão W83 e 381, enquanto o efeito oposto foi encontrado em ATCC 33277. Dessa forma, os autores concluíram que a expressão da cápsula em *P. gingivalis* dificulta a formação de biofilme e conseqüentemente aumenta a disseminação da bactéria, como justificativa propõem que a divergência entre as funções da GT nas cepas padrão ocorra por diferenças no genoma na região ao redor do gene PG 0106.

No DD PCR foi demonstrada diferença na expressão de genes entre biofilmes de periodontite e de saudável, os dados foram confirmados por PCR em tempo real, porém também foi demonstrado que quando a comparação da expressão relativa foi realizada entre as amostras de biofilme e planctônicas de ambas as condições houve expressão positiva nas amostras planctônicas, sugerindo que GT pode estar relacionada com o controle da formação de biofilme nas amostras clínicas de *P. gingivalis*, confirmando o resultado encontrado por Davey; Duncan (2006).

Proteína ClpB (PG 1118)

Proteínas Clp-HSP 100 (proteína de choque térmico 100) compõem uma família de ATPases que atuam como chaperonas e subunidades de ATPase para proteases Clp dependentes de ATP, muitas delas são induzidas pelo estresse e estão relacionadas com a tolerância ao estresse (CHASTANET et al., 2004) e também possuem papel na manutenção da morfologia e na virulência (CHASTANET et al., 2004; YUAN et al., 2007). Esta família possui uma região altamente conservada de 220 aminoácidos, referidos como domínio AAA, com vários domínios conservados, inclusive aqueles necessários para a ligação ao ATP e hidrólise (FREES et al. 2004).

Durante a exposição a temperaturas desnaturantes ou estresse, proteínas tendem a perder sua atividade até formarem grandes agregados insolúveis (MOTOHASHI et al., 1999; FREES et al., 2004). ClpB é um sistema protetor que se liga às proteínas desnaturadas e as direciona para retornar à sua estrutura original, com auxílio de outras proteínas como DnaK/ DnaJ e GrpE (CAPESTANY et al., 2008).

P. gingivalis passa por diversos estresses ambientais durante a progressão da doença periodontal, incluindo o aumento da temperatura em relação à temperatura corporal (FEDI; KILLLOW, 1992). ClpB tem papel na tolerância ao calor em bactérias como *Listeria monocytogenes* (CHASTANET et al., 2004) e os resultados de Yuan et al. (2007) também demonstram que ClpB é responsável pela resistência ao aumento da temperatura, mas não à presença de peróxido de hidrogênio e pH desfavorável.

Em estudo de Capestany et al. (2008) a perda de ClpB em *P. gingivalis* 33277 não afetou a tolerância ao calor, os autores acreditam que proteínas como a proteína de estresse universal (UspA) e a protease serina periplasmática (HtrA) possam contribuir para esta função, permitindo à ClpB desempenhar outros papéis importantes e que a perda de *clpB* pode alterar a expressão de múltiplos genes sugerindo seu envolvimento em diferentes funções celulares de *P. gingivalis*. ClpB parece não estar envolvida na invasão, mas é importante para a sobrevivência intracelular de *P. gingivalis* (CAPESTANY et al., 2008). Yuan et al. (2007) relatam que a proteína ClpB é importante para virulência *in vivo* de *P. gingivalis*. Em *Bacteroides fragilis* a proteína está relacionada com exportação de substratos.

A expressão positiva do gene PG 1118 em amostras de *P. gingivalis* de pacientes sadios formando biofilme em comparação com a mesma amostra no estado planctônico foi confirmada pelo PCR em tempo real. Somado a isso, foi demonstrado pelo PCR em tempo real que a diferença de expressão entre o estado planctônico e formando biofilme da amostra isolada de pacientes com periodontite foi positiva para aquela que estava formando biofilmes. Dessa forma pode-se deduzir que durante a formação de biofilmes a proteína seja requerida para desempenhar um papel na manutenção do mesmo. Capestany et al. (2008) propõem uma função para o gene *clpB* através da sua inativação durante a formação de biofilme na presença de *S. gordonii*. Apesar de não afetar o acúmulo total de *P. gingivalis*, houve alteração na arquitetura do biofilme formado, resultando em menor número de microcolônias, porém de maior volume. Assim, é possível que ClpB tenha papel na regulação da formação de biofilme misto com *S. gordonii*, conferindo a *P. gingivalis* a propriedade de controlar o acúmulo de outras células de *P. gingivalis*, otimizando as condições ecológicas como a tensão de oxigênio e a disponibilidade de nutrientes para se manter.

Formato tetrahydrofolato ligase (PG 1321)

Formato tetrahydrofolato ligase é uma enzima que faz parte da via de transferência de carbono primário, alternativamente é chamada de formil tetrahydrofolato sintase (RABINOWITZ; PRICE JR., 1962). No metabolismo de bactérias metilotróficas aeróbias utilizando substratos de carbono simples há produção de formaldeído como intermediário central (MARX et al., 2003). Em *Methylobacterium extorquens* AM1, um facultativo metilotrófico, o formaldeído produzido pela oxidação primária de substratos de carbono simples, se condensa com o tetrahydrofolato (H_4F) ou tetrahidrometanopterina (H_4MPT) para formar derivados metilenos. O formaldeído pode reagir espontaneamente com H_4F resultando em metileno H_4F , esse substrato serve como doador de carbono primário para assimilação de formaldeído, através do ciclo da serina, com auxílio da enzima metileno H_4F desidrogenase dependente de NADP. Alternativamente o metileno H_4F pode ser convertido para metenil H_4F e formar formil

H₄F, pela ação da enzima metenil H₄F ciclohidrolase (POMPER et al., 1999; VORHOLT, et al., 1998).

Juntamente com a conversão de ADP-ATP, formil H₄F pode ser reversivelmente oxidado para formato e H₄F livre pela ação da formato H₄F ligase. O formato pode ser oxidado para CO₂ pela formato desidrogenase (MARX et al., 2003). Em estudo de Himes; Rabinowitz (1962) utilizando formato H₄F ligase de fígado de pombo, *Micrococcus aerogenes* e *Clostridium cylindrosporium* encontraram que para a ação da enzima é necessária a presença de íons bivalentes como o magnésio (Mg⁺²) e o manganês (Mn⁺²).

Bactérias metanogênicas são anaeróbios estritos com a capacidade de produzir metano de H₂ /CO₂, mas em alguns casos, de formato, acetato, metanol e metilamina. Cerca de um terço da população americana abriga espécies metanogênicas em seus intestinos, e elas também têm sido encontradas em amostras de biofilme dental subgengival de humanos. Os autores relatam ainda que a presença de bactérias metanogênicas é diretamente proporcional à severidade da doença periodontal (BELAY et al., 1988).

Os resultados do DD PCR foram confirmados por PCR em tempo real. A expressão foi positiva para amostras de biofilme de isolados clínicos de pacientes saudáveis em comparação com biofilme de pacientes com periodontite. Foi verificado também que amostras de biofilme de ambas as condições em comparação com seus parceiros planctônicos expressam positivamente esse gene. A presença de bactérias metanogênicas em bolsas periodontais ou formando biofilme possibilita uma íntima relação dessas com periodontopatógenos, como *P. gingivalis*, essa proximidade podia resultar em transferência horizontal de genes. Uma possível aquisição do gene PG 1321 por *P. gingivalis* poderia capacitar a célula a utilizar mais um substrato para suas atividades metabólicas com o intuito de obter energia (WATNICK; KOLTER, 2000), podendo até atuar como mais um fator de virulência; no entanto estes aspectos precisam ser mais estudados.

Proteína hipotética (PG 1367)

A sequência dessa proteína não possui nenhuma analogia de sequência com genes conhecidos de outras bactérias em banco de dados de genes. Ela foi expressa positivamente em biofilmes de pacientes com periodontite do que em biofilmes de pacientes saudáveis. Analisando a expressão por PCR em tempo real nas outras comparações, verificou-se que esta proteína foi expressa positivamente nas amostras planctônicas em relação às suas contrapartes formando biofilme. Pode-se especular que esta proteína tenha um envolvimento com alguma função que impeça ou iniba a formação de biofilmes, mas apenas um estudo mutacional poderia confirmar a participação deste gene neste evento.

Proteína hipotética (PG 1580)

A sequência da proteína hipotética tem analogia com a sequência do Fator de von Willebrand de *Chlorobium chlorochromatii*.

O fator de von Willebrand (vWf) é um índice do plasma bem estabelecido de disfunção e dano epitelial (FREESTONE et al., 2007) produzido por células endoteliais e armazenado nelas (LIP; BLANN, 1995), que está elevado em pacientes com fibrilação atrial, arritmia cardíaca, hipertensão, *Diabetes mellitus*, hipercolesterolemia e fumo (LIP; BLANN, 1997). O vWf tem papel na adesão e agregação de plaquetas e na coagulação. Elevados níveis de vWf podem aumentar o risco da formação de trombos em pacientes com aterosclerose pré existente (LIP; BLANN, 1995). Aterosclerose é uma doença inflamatória progressiva caracterizada pela formação de ateroma, sendo uma das principais causas do infarto do miocárdio (LEIVADAROS et al., 2005).

Mattila (1989) associa níveis elevados de vWF com pobre higiene oral, e Lip; Blann (1997) relacionam com pacientes com periodontite severa e células endoteliais danificadas. A periodontite pode ser relacionada com a espessura da parede arterial e segundo relatos de Haratz et al. (2000) periodontopatógenos como *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola* e *P. intermedia* foram encontrados em placas ateroscleróticas. Na periodontite, uma doença inflamatória crônica, outros marcadores inflamatórios sistêmicos, reconhecidos como fatores de risco para a doença cardiovascular, também estão elevados, como a proteína C reativa, interleucina-6 (IL-6),

fibrinogênio e contagem de células brancas (LOOS et al., 2000), reforçando os achados com vWf.

Os resultados do DD PCR apontaram para uma expressão positiva do gene durante a formação de biofilme de pacientes com periodontite em comparação com biofilme de pacientes saudáveis, o que posteriormente foi comprovado pelo PCR em tempo real. A possibilidade de bactérias sintetizarem o fator de von Willebrand levanta uma importante questão sobre a produção de marcadores de risco de doenças sistêmicas cardiovasculares por fontes exógenas, e pode representar mais um fator de virulência bacteriano que mantém ou induz inflamações sistêmicas crônicas.

Transcetolase (PG 1748)

A via das pentose fosfato é uma via alternativa de oxidação da glicose e a única via de produção de ribose-5-fosfato. Esta via possui diversos papéis importantes no metabolismo, incluindo esqueletos biossintéticos e o suprimento de poder redutor (NAPDH), forma na qual a energia derivada da glicólise é armazenada (MARZZOCO; BAPTISTA, 1990). Dos seus metabólitos intermediários, a ribose-5-fosfato (ribose-5-P) e a eritrose-4-fosfato (eritrose-4-P), são importantes precursores para a biossíntese de nucleotídeos e aminoácidos aromáticos, respectivamente (KAMADA et al., 2001).

A transcetolase (TKT) é uma enzima chave no ramo não oxidativo da via pentose fosfato, é também chamada de glicol aldeído transferase, sendo encontrada em todos os organismos (WIKNER et al., 1994). A TKT transfere 2 carbonos glicol aldeído da cetose ou cetose fosfato (substrato doador) para aldose ou aldose fosfato (substrato aceptor) com função na produção de aminoácidos aromáticos, purinas e pirimidinas. Participam dessa reação co fatores como tiamina difosfato e cátions bivalentes (Ca^{+2} e Mg^{+2}) (SEVOSTYANOVA; SOLOVJEVA; KOCHETOV, 2006). TKT cria uma ligação reversível entre a glicólise e a via da pentose fosfato, junto com a transaldolase,

permitindo à célula mover para um lado e para o outro intermediários entre as duas vias (KAMADA et al., 2001).

A TKT foi regulada positivamente em biofilme de amostras de pacientes com periodontite em comparação com biofilme de pacientes saudáveis, tanto nos experimentos do DD PCR quanto naqueles de confirmação por PCR em tempo real. Uma possível explicação para essa regulação positiva em biofilme de periodontite é uma maior necessidade de energia e de nucleotídeos para desempenhar suas funções quando a bactéria se encontra neste estado.

A metodologia do DD PCR para *P. gingivalis* foi empregada por diferentes autores com várias aplicações, mas com o objetivo comum de detectar genes diferencialmente expressos em condições distintas, sempre usando amostras padrão. Este estudo analisou a expressão gênica de isolados clínicos de *P.gingivalis*, no intuito de aproximar-se o máximo possível das condições encontradas na cavidade bucal, e mostrou que esta metodologia foi válida para identificação de genes expressos diferencialmente tanto em amostras de biofilme como planctônicas do isolado clínico de sítio com e sem perda de inserção. Apesar da confirmação da expressão através de técnica bastante sensível como o PCR em tempo real, acreditamos que somente a construção de linhagens mutantes de alguns destes genes poderia determinar se sua expressão positiva ou negativa se reflete, exercendo uma função, na formação do biofilme.

5 CONCLUSÕES

- Verificou-se diferença na formação de biofilme misto entre *S. gordonii* e amostras de *P. gingivalis* provenientes de pacientes com periodontite e saudáveis, embora não estatisticamente significativa.
- Verificou-se diferença na expressão de genes de *P. gingivalis* provenientes de diferentes condições clínicas durante a formação de biofilme.
- Verificou-se diferença na expressão de genes de *P. gingivalis* entre o estado planctônico e estabelecido em biofilme de amostras de paciente com periodontite e saudável.
- Apenas uma parte dos genes expressos diferencialmente no Differential Display foi confirmada por Real Time PCR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABOU-RAYA, S.; NAEEM, A.; ABOU-EL KHEIR, H.; EL BELTAGY, S. Coronary artery disease and periodontal disease: is there a link? **Angiology**, v. 53, p. 141-148, 2002.

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

BELAY, N.; JOHNSON, R.; RAJAGOPAL, B.S.; DE MACARIO, E.C.; DANIELS, L. Methanogenic bacteria from human dental plaque. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, p. 600-603, 1988.

BELOIN, C.; GHIGO, J-M. Finding gene-expression pattern in bacterial biofilms. **Trends Microbiol.**, v. 13, p. 16-19, 2005.

BONASS, W.A.; MARSH, P.D.; PERCIVAL, P.S.; ADUSE OPOKU, J.; HANLEY, S.A.; DEVINE, D.A.; CURTIS, M.A. Identification of *ragAB* as a temperature-regulated operon of *Porphyromonas gingivalis* W50 using Differential display of randomly primed RNA. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 4012-4017, 2000.

BRETON, C.; IMBERTLY, A. Structure/ function studies of glycosyltransferases. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 9, p. 563-517, 1999.

BRETON, C.; SNAJDROVÁ, L.; JEANNEAU, C.; KOCA, J.; IMBERTY, A. Structures and mechanisms of glycosyltransferases. **Glycobiology**, v. 16, p. 29R-37R, 2006.

CALIFANO, J.V.; KITTEN, T.; LEWIS, J.P.; MACRINA, F.L.; FLEISCHMANN, R.D.; FRASER, C.M.; DUNCAN, M.J.; DEWHIRST, F.E. Characterization of *Porphyromonas gingivalis* insertion sequence-like element ISPg5. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 5247-5253, 2000.

CAPESTANY, C.A.; TRIBBLE, G.D.; MAEDA, K.; DEMUTH, D.R.; LAMONT, R.J. Role of the Clp system in stress tolerance, biofilm formation, and intracellular invasion in *Porphyromonas gingivalis*. **J. Bacteriol.**, v. 190, p. 1436-1446.

CHASTANET, A.; DERRE, I.; NAIR, S.; MSADEK, T. *clpB*, a novel member of the *Listeria monocytogenes* CtsR regulon, is involved in virulence but not in general stress tolerance. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 1167-1174.

* De acordo com:

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

CHUNG, W.O.; DEMUTH, D.R.; LAMONT, R.J. Identification of a *Porphyromonas gingivalis* receptor for the *Streptococcus gordonii* SspB protein. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 6758-6762, 2000.

CHUNG, W.O.; PARK, Y.; LAMONT, R.J.; MC NAB, R.; BARBIERI, B.; DEMUTH, D.R. Signaling system in *Porphyromonas gingivais* based on a LuxS protein. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 3903-3909, 2001.

COOK, G.S.; COSTERTON, J.W.; LAMONT, R.J. Biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii*. **J. Periodont. Res.**, v. 33, p. 323-327, 1998.

DASANAYAKE, A.P.; BOYD, D.; MADIANOS, P.N.; OFFENBACHER, S.; HILLS, E. The association between *Porphyromonas gingivalis*-specific maternal serum IgG and low birth weight. **J. Periodontol.**, v. 72; p. 1491-1497, 2001.

DAVEY, M.E.; DUNCAN, M.J. Enhanced biofilm formation and loss of capsule synthesis: deletion of a putative glycosyltransferase in *Porphyromonas gingivalis*. **J. Bacteriol.**, v. 188, p. 5510-5523, 2006.

DESHPANDE, R. G.; KHAN, M.B.; GENCO, C.A. Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 5337-5343, 1998.

DU, L.D.; KOLENBRANDER, P.E. Identification of salivary-regulated genes of *Streptococcus gordonii* DL1 by differential display using random arbitrarily primed PCR. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 4834-4837, 2000.

DZINK, J.L.; SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A. D. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, v. 15, p. 316-323, 1988.

FEATHERSTONE, J.D.; ZERO, D.T. An in situ model for simultaneous assessment of inhibition of demineralization and enhancement of remineralization. **J. Dent. Res.**, v. 71, p. 804-810, 1992.

FEDI, P.F.; KILLOW, W.J. Temperature differences at periodontal sites in healthy and disease. **J. Periodontol.**, 1992, v. 63, p. 4839-4846.

FISLAGE, R.; BERCEANU, M.; HUMBOLDT, Y.; WENDT, M.; OBERENDER, H. Primer design for a prokaryotic differential display RT-PCR. **Nucl. Acids Res.**, v. 25, p. 1830-1835, 1997.

FREES D.; CHASTANET, A.; QAZI, S.; SORENSEN, K.; HILL, P.; MSADEK, T.; INGMER, H. Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Mol. Microbiol.**, v. 54, p. 1445-1462.
FREESTONE, B.; CHONG, A.Y.; NUTTAL, S.; BLANN, A.D.; LIP, G.Y.H. Soluble E-selectin, von Willebrand factor, soluble thrombomodulin, and total body nitrate/nitrite

products as indices of endothelial damage/dysfunction in paroxysmal, persistent, and permanent atrial fibrillation. **Chest**, v. 132, p. 1253-1258, 2007.

GENCO, C.A.; SIMPSON, W.; FORNG, R.Y.; EGAL, M.; ODUSANYA, B.M. Characterization of a Tn4351-generated hemin uptake mutant of *Porphyromonas gingivalis*: evidence for the coordinate regulation of virulence factors by hemin. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 2459-2466, 1995.

GILL, R.T.; VALDES, J.J.; BENTLEY, W.E.; Reverse transcription-PCR differential display analysis of *Escherichia coli* global gene regulation in response to heat shock. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 5386-5393, 1999.

GOULBOURNE, P.A.; ELLEN, R.P. Evidence that *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* fimbriae function in adhesion to *Actinomyces viscosus*. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 5266-5274, 1991.

GRENIER, D. Demonstration of a bimodal coaggregation reaction between *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. **Oral Microbiol. Immun.**, v. 7, p. 280-284, 1992.

GRENIER, D.; MAYRAND, D. Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*. **Infect. Immun.**, v. 55, p. 111-117, 1987.

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

HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.A.; TANNER, A.; POLLACK, R.P.; SMITH, C.; KENT JR, R.L.; SOCRANSKY, S.S. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. **J. Clin. Periodontol.**, v.25, p. 346-353, 1998.

HAMADA, N.; WATANABE, K.; ARAI, M.; HIRAMINE, H.; UMEMOTO, T. Cytokine production induced by a 67-kDa fimbrial protein from *Porphyromonas gingivalis*. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 17, p. 197-200, 2002.

HARATZ, V.I.; ZAMBON, J.J.; TREVISAN, M.; ZEID, M.; GENCO, R.J. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. **J. Periodontol.**, v. 71, p. 1554-1560, 2000.

HIMES, R.H.; RABINOWITZ, J.C. Formyltetrahydrofolate synthase. II-Characteristics of the enzyme and the enzymic reaction. **J. Biol. Chem.**, v. 237, p. 2903-2914, 1962.

HIRAMINE, H.; WATANABE, K.; HAMADA, N.; UMEMOTO, T. *Porphyromonas gingivalis* 67-kDa fimbriae induced cytokine production and osteoclast differentiation utilizing TLR2. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 229, p. 49-55, 2003.

IMAMURA, T.; POTEMPA, J.; PIKE, R.N.; MOORE, J.N.; BARTON, M.H.; TRAVIS, J. Effect of free vesicle-bound cysteine proteinases of *Porphyromonas gingivalis* on plasma clot formation: implications for bleeding tendency at periodontal sites. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 4877-4882, 1995.

JAMES, C.E.; HASEGAWA, Y.; PARK, Y.; YEUNG, V.; TRIBBLE, G.D.; KUBONIWA, M.; DEMUTH, D.R.; LAMONT, R.J. LuxS involvement in the regulation of genes coding for hemin and iron acquisition systems in *Porphyromonas gingivalis*. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 3834-3844, 2006.

KAMADA, N.; YASUHARA, A.; TAKANO, Y.; NAKANO, T.; IKEDA, M. Effect of transketolase modifications on carbon flow to the purine-nucleotide pathway in *Corynebacterium ammoniagenes*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 56, p. 710-717, 2001.

KATZ, J.; YANG, Q.-B.; ZHANG, P.; POTEMPA, J.; TRAVIS, J.; MICHALEK, S.M.; BALKOVETZ, D.F. Hydrolysis of epithelial junction by *Porphyromonas gingivalis* gingipains. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 2512-2518, 2002.

KINDER, S.A.; HOLT, S.C. Characterizations of coaggregation between *Bacteroides gingivalis* T22 and *Fusobacterium nucleatum* T18. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 3425-3433, 1989.

KLEIN, M.I.; GONÇALVES, R.B. Detection of *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) and *Porphyromonas gingivalis* by polymerase chain reaction in subjects with different periodontal status. **J. Periodontol.**, v. 74, p. 798-802, 2003.

KOLENBRANDER, P.E.; LONDON, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 3247-3252, 1993.

KOLENBRANDER, P.E.; PLAMER JR., R.J.; RICKARD, A.H.; JAKUBOVICS, N.S.; CHALMERS, N.I.; DIAZ, P.I. Bacterial interactions and successions during plaque development. **Periodontol. 2000**, v. 42, p. 47-79, 2006.

KURAMITSU, H.K.; KANG, I.C.; QI, M. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implications for cardiovascular diseases. **J. Periodontol.**, v. 74, p. 85-89, 2003.

LAMONT, R.J.; HSIAO, G.W.; GIL, S. Identification of a molecule of *Porphyromonas gingivalis* that binds to *Streptococcus gordonii*. **Microbial Pathog.**, v. 17, p. 355-360, 1994.

LAMONT, R.J.; JENKINSON, H.F. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 62, p. 1244-1263, 1998.

LAMONT, R.J.; EL-SABAENY, A.; PARK, Y.; COOK, G.S.; COSTERTON, J.W.; DEMUTH, D.R. Role of the *Streptococcus gordonii* SspB protein in the development of

Porphyromonas gingivalis biofilms on streptococcal substrates. **Microbiology**, v. 148, p. 1627-1636, 2002.

LEIVADAROS, E.; VAN DER VELDEN, U.; BIZZARO, S.; TEN HEGGELER, M.A.G.; GERDES, V.E.A.; HOEK, F.J.; NAGY, T.O.M.; SCHOLMA, J.; BAKKER, S.J.L.; GANS, R.O.G.; TEM CATE, H.; LOOS, B.G. A pilot study into measurements of markers of atherosclerosis in periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 76, p. 121-128, 2005.

LI, J.; HELMERHORST, E.J.; LEONE, C.W.; TROXLER, R.F.; YASKELL, T.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S.; OPPENHEIM, F.G. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. **J. Appl. Microbiol.**, v. 97, p. 1311-1318, 2004.

LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eukariotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, v. 257, p. 967-971, 1992.

LIBBY, P. Atheroma: more than mush. **Lancet**, v. 348, p. S4-S7, 1996.

LIN, X.; WU, J.; XIE, H. *Porphyromonas gingivalis* minor fimbriae are required for cell-cell interactions. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 6011-6015, 2006.

LIP, G.Y.H.; BLANN, A. Von Willebrand factor and its relevance to cardiovascular disorders. **Br. Heart J.**, v. 74, p. 580-583, 1995.

LIP, G.Y.H.; BLANN, A. Von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders? **Cardiovasc. Dis.**, v. 34, p. 255-265, 1997.

LÖE, H. THEILADE, E.; JENSEN, S.B. Experimental gingivitis in man. **J. Periodontol.**, v. 36, p. 5-15, 1965.

LOOS, B.G.; CRAANDIJK, J.; HOEK, F.J.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E.; VAN DER VELDEN, U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. **J. Periodontol.**, v. 71, p. 1528-1534, 2000.

MAEDA, K.; NAGATA, H.; NONAKA, A.; KATAOKA, K.; TANAKA, M. SHIZUKUISHI, S. Oral streptococcal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mediates interaction with *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. **Microb. Infect.**, v. 6, p. 1163-1170, 2004.

MARSH, P.D. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, p. 7-15, 2005.

MARX, C.J.; LAUKEL, M.; VORHOLT, J.A.; LIDSTROM, M.E. Purification of the formate tetrahydrofolate ligase from *Methylobacterium extorquens* AM1 and demonstration of its requirement for methylotrophic growth. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 7169-7175, 2003.

MATTILA, K.; RASI, V.; NIEMINEN, M.; VALTONEN, V.; KESÄNIEMI, A.; SYRJÄLÄ, S.; JUNGELL, P.; HUTTUNEN, JK. Von Willebrand factor antigen and dental infections. **Tromb. Res.**, v. 56, p. 325-329, 1989.

MÖLLER, A.J.R. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. **Odontol. Tidskr.**, v. 74, p. 380, 1966.

MOMBELLI, A.; SCHMID, B.; RUTAR, A.; LANG, N. Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 71, p. 14-21, 2000.

MOTOHASHI, K.; WATANABE, Y.; YOHDA, M.; YOSHIDA, M. Heat-inactivated proteins are rescue by the DnaK-J-GrE set and ClpB chaperones. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 7184-7189, 1999.

NAKAO, R.; SENPUKU, H.; WATANABE, H. *Porphyromonas gingivalis galE* is involved in lipopolysaccharide O-Antigen synthesis and biofilm formation. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 6145-6153, 2006.

NOACK, B.; GENCO, R.J.; TREVISAN, M.; GROSSI, S.; ZAMBON, J.J.; DE NARDIN, E. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. **J. Periodontol.**, v. 72, p. 1221-1227, 2001.

O'TOOLE, G.A.; KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. **Mol. Microbiol.**, v. 28, p. 449-461, 1998.

PAULSON, J.C.; COLLEY, K.J. Glycosyltransferases. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 17616-17618, 1989.

PARK, Y.; YILMAZ, O.; JUNG, I-Y.; LAMONT, R.J. Identification of *Porphyromonas gingivalis* genes specifically expressed in human gingival epithelial cells by using differential display reverse transcription-PCR. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 3752-3758, 2004.

PARK, Y.; SIMIONATO, M.R.; SEKYIA, K.; MURAKAMI, Y.; JAMES, D.; CHEN, W.; HACKETT, M.; YOSHIMURA, F.; DEMUTH, D.R.; LAMONT, R.J. Short fimbriae of *Porphyromonas gingivalis* and their role in coadhesion with *Streptococcus gordonii*. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 3983-3989, 2005.

POMPER, B.K.; VORHOLT, J.A.; CHISTOSERDOVA, L.; LIDSTROM, M.E.; THAUER, R.K. A methenyl tetrahydromethanoptercyclohydrolase and methenyl tetrahydrofolate cyclohydrolase in *Methylobacter extorquens* AM1. **Eur. J. Biochem.**, v. 261, p. 475-480, 1999.

RIDKER, P.M., CUSHMAN, M., STAMPFER, M.J., TRACY, R.P., HENNEKENS, C.H. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. **N. Engl J. Med.**, v. 336, p. 973-979, 1997.

ROSAN, B.; LAMONT, R.K. Dental plaque formation. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 1599-1607, 2006.

RUDNEY, S.D.; TRAN, J.D. Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 2674-2678, 1996.

SEVOSTYANOVA, I.A.; SOLOVJEVA, O.N.; KOCHETOV, G.A. Two methods for determination of transketolase activity. **Biochemistry Mosc.**, v. 71, p. 693-696, 2006.

SHAPIRA, L.; AYALON, S.; BRENNER, T. Effects of *Porphyromonas gingivalis* on the central nervous system: activation of glial cells and exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Periodontol.**, v. 73, p. 511-516, 2002.

SHELBURNE, C.E.; GLEASON, R.M.; COULTER, W.A.; LANTZ, M.S.; LOPATIN, D.E. Differential display analysis of *Porphyromonas gingivalis* gene activation response to heat and oxidative stress. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 20, p. 233-238, 2005.

SIMIONATO, M.R.; TUCKER, C.M.; KUBONIWA, M.; LAMONT, G.; DEMUTH, D.R.; TRIBBLE, G.D.; LAMONT, R.J. *Porphyromonas gingivalis* Genes Involved in Community Development with *Streptococcus gordonii*. **Infect. Immun.**, v.74, p. 6419-6428, 2006.

SLOTS, J.; GIBBONS, R.J. Attachment of *Bacteroides melaninogenicus* subsp. *Asaccharolyticus* to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and of periodontal pockets. **Infect. Immun.**, v. 19, p. 254-264, 1978.

SLOTS, J.; TING, M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. **Periodontol.** 2000, v. 20; p. 82-121, 1999.

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

SOCRANSKY, S.S.; SMITH, C.; HAFFAJEE, A.D. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 29, p. 260-268, 2002.

STOODLEY, P. SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 56, p. 187-209, 2002.

SURETTE, M.G.; MILLER, M.B.; BASSLER, B.L. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: A new family of genes responsible for autoinducer production. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 96, p. 1639-1644, 1999

TAKEUCHI, Y.; UMEDA, M.; SAKAMOTO, M.; BENNO, Y.; HUANG, Y.; ISHIKAWA, I. *Treponem socranskii*, *Treponema denticola*, and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity periodontal tissue destruction. **J. Periodontol.**, v. 72, p. 1354-1363, 2001.

TANNER, A., MAIDEN, M.F.J.; MACUCH, P.J.; MURRAY, L.L.; KENT JR, R.L. Microbiota of health, gingivitis and initial periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 25, p. 85-98, 1998.

TSAI, J.P.; SHI, W. Analysis of gene expression in *Treponema denticola* with differential display polymerase chain reaction. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 15, p. 305-308.

VAN WINKELHOFF, A.J.; LOOS, B.G.; VAN DER REIJDEN, W.A.; VAN DER VELDEN. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. **J. Clin. Periodontol.**, v. 29, p. 1023-1028, 2002.

VORHOLT, J.A.; CHISTOSERDOVA, L.; LIDSTROM, M.E.; THAUER, R.K. The NADP-dependent methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase in *Methylobacter extorquens* AM1. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 5351-5356, 1998.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 2675-2679, 2000.

WIKNER, C.; MESHALKINA, L.; NILSSON, U.; NIKKOLA, M.; LINDQVIST, Y.; SUNDSTRÖM, M.; SCHNEIDER, G. Analysis of a variant cofactor-protein interaction in thiamin diphosphate-dependent enzyme by site-directed mutagenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 169, p. 32144-32150, 1994.

XIE, H.; KOZLOVA, N.; LAMONT, R.J. *Porphyromonas gingivalis* Genes Involved in *fimA* Regulation. **Infect. Immun.**, v.72, p. 651-658, 2004.

XYMENÉZ-FYVIE, L.A.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 27, p. 722-732, 2000.

YAMAMOTO, F.; CLAUSEN, H.; WHITE, T.; MARKEN, J.; HAKOMORI, S. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. **Nature**, v. 345, p. 229-233, 1990.

YILMAZ, O. The chronicles of *Porphyromonas gingivalis*: the microbium, the human oral epithelium and their interplay. **Microbiology**, v. 154, p. 2897-2903, 2008.

YUAN, L.; RODRIGUES, P.H.; BÉLANGER, M.; DUNN JR, W.; PROGULSKE-FOX, A. The *Porphyromonas gingivalis* *clpB* gene is involved in cellular invasion and virulence *in vivo*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 51, p. 388-398, 2007.

ZAMBON, J.J. Periodontal Diseases : microbial factors. **Ann. Periodontol.**, v. 1, p. 879-925, 1996.

ANEXO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: Identificação de genes de isolados clínicos de *Porphyromonas gingivalis* expressos diferencialmente na formação de biofilme, usando Differential Display PCR

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu, _____, residente e domiciliado na _____, portador da Cédula de identidade, RG _____, e inscrito no CPF/MF _____ nascido(a) em ____ / ____ / _____, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo "Identificação de genes de isolados clínicos de *Porphyromonas gingivalis* expressos na formação de biofilme, usando Differential Display PCR". Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

- I) O estudo se faz necessário para que se possa descobrir como esta bactéria causa a doença periodontal (de gengiva) e assim propor novos métodos para a prevenção desta doença.
- II) Será feita uma única coleta de placa dental (material acumulado sobre a superfície dos dentes), de três dentes e uma única coleta de saliva;
- III) Essas coletas serão feitas apenas para este estudo e em nada influenciarão o meu tratamento; não vão me curar; não vão me causar nenhum problema;

- IV) A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me acarretará qualquer ônus pecuniário com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados com o estudo;
- V) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- VI) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VII) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- VIII) Entendo que minha participação é voluntária e não serei recompensado financeiramente pela minha participação;
- IX) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa

☐ Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

☐ Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

São Paulo, ____ de _____ de 2007

☐ Paciente/☐ Responsável

Testemunha 1 : _____

Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____

Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: Profa. Dra. Maria Regina Lorenzetti Simionato
Departamento de Microbiologia – ICB/USP
Cirurgiã – Dentista – CROSP 17773

Telefone para contato: 11 3091-7201